

**(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION  
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)**

**(19) Organisation Mondiale de la Propriété  
Intellectuelle  
Bureau international**



**(43) Date de la publication internationale  
19 février 2004 (19.02.2004)**

**PCT**

**(10) Numéro de publication internationale  
WO 2004/014952 A2**

**(51) Classification internationale des brevets<sup>7</sup> : C07K 16/26**  
Major Flandre, F-34090 MONTPELLIER (FR). RIEUNIER, François [FR/FR]; 5, rue du Bois, F-78390 BOIS D'ARCY (FR).

**(21) Numéro de la demande Internationale : PCT/FR2003/002483**

**(74) Mandataires : BERNASCONI, Jean etc.; CABINET LAVOIX, 2, place d'Estienne d'Orves, F-75441 PARIS CEDEX 09 (FR).**

**(22) Date de dépôt international : 7 août 2003 (07.08.2003)**

**(81) États désignés (national) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SI, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.**

**(25) Langue de dépôt : français**

**(84) États désignés (régional) : brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).**

**(26) Langue de publication : français**

**(30) Données relatives à la priorité : 02 10063 7 août 2002 (07.08.2002) FR**

**Publiée :**

**— sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport**

**(71) Déposants (pour tous les États désignés sauf US) : BIO-RAD PASTEUR [FR/FR]; 3, boulevard Raymond Poincaré, F-92430 MARNES LA COQUETTE (FR). CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (C.N.R.S) [FR/FR]; 3, rue Michel Ange, F-75016 PARIS (FR). UNIVERSITÉ MONTPELLIER I [FR/FR]; Boulevard Henri IV, F-34060 MONTEPELLIER CEDEX 1 (FR).**

**En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.**

**(72) Inventeurs; et**

**(75) Inventeurs/Déposants (pour US seulement) : PAU, Bernard [FR/FR]; Le Mas Clos n°6, Rue Sainte Geneviève, F-34080 MONTPELLIER (FR). GIULIANI, Isabelle [FR/FR]; Résidence Occitanie, 200, avenue du**

**En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.**

**(54) Title: SPECIFIC ANTIBODIES FOR DIAGNOSING HEART FAILURE**

**(54) Titre : ANTICORPS SPECIFIQUES POUR LE DIAGNOSTIC DE L'INSUFFISANCE CARDIAQUE**

**(57) Abstract:** The invention relates to in vitro diagnosis of heart failure. More specifically, the invention relates to specific antibodies of a peptide domain which is situated on either side of hinge region R76S77 of proBNP(1-108). In particular, the invention relates to a method of obtaining the aforementioned antibodies and to the use thereof in detecting blood proBNP(1-108) with the exception of BNP(1-76) and BNP(77-108). The invention also relates to a method of detecting blood proBNP(1-108), reagents and a kit for same.

**(57) Abrégé :** L'invention concerne le domaine du diagnostic in vitro de l'insuffisance cardiaque. L'invention concerne plus particulièrement des anticorps spécifiques d'un domaine peptidique situé de part et d'autre de la zone charnière R76S77 du proBNP(1-108). L'invention concerne plus particulièrement un procédé d'obtention de ces anticorps et leur utilisation pour détecter le proBNP(1-108) sanguin à l'exclusion du BNP(1-76) et du BNP(77-108). L'invention concerne aussi un procédé de détection du proBNP(1-108) sanguin, des réactifs et une trousse pour le mettre en œuvre.

**WO 2004/014952 A2**

## Anticorps spécifiques pour le diagnostic de l'insuffisance cardiaque

L'invention concerne le domaine du diagnostic *in vitro* de l'insuffisance cardiaque ventriculaire.

5 L'insuffisance cardiaque (Congestive heart failure) est un syndrome clinique fréquent, en particulier chez les personnes âgées. Il se présente habituellement sous la forme d'un déclenchement insidieux de symptômes non-spécifiques tels que la toux à l'effort, la fatigue, et l'apparition d'œdèmes périphériques. Le diagnostic repose classiquement sur l'étude de divers 10 paramètres tels que les signes cliniques (classés en 4 stades: stades I à IV de la NYHA (c'est-à-dire de l'Association de Cardiologie de New York), l'échocardiographie, la scintigraphie, le test d'effort, etc..

15 En raison de la gravité de la maladie cardiaque et, aussi, des coûts élevés de sa prise en charge, un diagnostic précoce de ce syndrome est, évidemment, très hautement souhaitable: il contribuerait à éviter la progression rapide du syndrome vers l'insuffisance cardiaque sévère. Identifier les personnes à risque d'insuffisance cardiaque est donc une nécessité. Cela permettrait aussi d'adapter un suivi thérapeutique plus rapide, plus facile et moins coûteux. Malheureusement, il n'existe pas de méthode diagnostique de 20 l'insuffisance cardiaque totalement satisfaisante et totalement informative.

25 On a recherché depuis longtemps des marqueurs présymptomatiques prédictifs de l'insuffisance cardiaque. A cet égard, on a mis en évidence le fait que les cardiomyocytes fabriquent et sécrètent des peptides à activité natriurétique : un peptide d'origine auriculaire, l'ANP (Atrial Natriuretic Peptide) découvert chez le rat par de Bold et al. *Life Science* 1981, vol. 28(1) : 89-94, et un peptide natriurétique d'origine auriculo-ventriculaire dénommé BNP (Brain Natriuretic Peptide) découvert par Sudoh et al., *Nature* 1988, vol. 332 : 78-81 chez le porc, puis ensuite chez l'homme.

30 Le précurseur du BNP est le préproBNP(1-134), forme de stockage de la molécule à l'intérieur des cardiomyocytes. Celui-ci est clivé pour libérer un peptide signal et le proBNP(1-108). Le proBNP(1-108) consiste en un polypeptide de 108 acides aminés, de séquence:

H<sub>1</sub>PLGSPGSASDLETSGLQEQRNH<sub>1</sub>LQGKLSELQVEQTSLEPLQESPRPTGV  
WKSREVATEGIRGHRKMVLYTLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGSGCFGRKMDRISSSSG  
LGCKVLRRH<sub>108</sub> (SEQ ID N° 1). Il est clivé, avant et/ou pendant sa sécrétion,  
entre les acides aminés Arg<sup>76</sup> et Ser<sup>77</sup> en, d'une part, le BNP, encore désigné  
5 BNP(77-108) ou BNP-32, voire BNP(1-32), et la partie N-terminale de la  
prohormone, le BNP(1-76), encore désigné fragment N-terminal du proBNP ou  
NT-proBNP.

Le BNP ou BNP(77-108), forme vasoréactive de la molécule, consiste en un  
peptide de 32 acides aminés, de séquence :

10 S<sub>77</sub>PKMVQGSGCFGRKMDRISSSSGLGCKVLRRH<sub>108</sub> (SEQ ID N° 2).

Le NT-proBNP ou BNP(1-76) consiste en les 76 acides aminés N-terminaux du  
proBNP(1-108) constituant la séquence suivante :

H<sub>1</sub>PLGSPGSASDLETSGLQEQRNH<sub>1</sub>LQGKLSELQVEQTSLEPLQESPRPTGV  
WKSREVATEGIRGHRKMVLYTLRAPR<sub>76</sub> (SEQ ID N° 3).

15 Le taux plasmatique de BNP hormonal, le BNP(77-108), est élevé chez  
les patients présentant une dystrophie ventriculaire. On a d'ailleurs décrit des  
dosages plasmatiques du BNP(77-108) l'utilisant comme marqueur prédictif de  
l'insuffisance cardiaque ventriculaire. Cependant, il est bien connu que  
l'hormone BNP(77-108) est peu stable. Il en résulte que son dosage nécessite  
20 des précautions particulières (Davidson, N. C. et al. Circulation 1995; 91:1276)  
(Gobinet-Georges et al. Clin. Chem. Lab. Med. 2000; 38:519-23). De plus, la  
demi-vie du BNP très courte et sa concentration plasmatique est peu élevée. Il  
en résulte qu'un certain nombre de réponses faussement négatives sont  
25 observées chez des sujets à risque d'insuffisance cardiaque. Ainsi, le dosage  
du BNP(77-108) ne permet pas de discriminer correctement les patients en  
stade I de la classification NYHA, des sujets sains (Clerico A. et al. J.  
Endocrinol. Invest. 1998; 21:170-9) (Del Ry S. et al. Scand. J. Clin. Lab. Invest.  
2000; 60:81-90).

30 Pour contourner cette difficulté, la demande de brevet WO 93/24531  
décrit une méthode de diagnostic *in vitro* de l'insuffisance cardiaque reposant  
sur la détection du BNP(1-76) (fragment N-terminal du proBNP), un composé  
abondant et qui a une longue demi-vie en comparaison de celle de l'hormone  
BNP(77-108). Toutefois, la méthode décrite dans la demande WO 93/24531

ne paraît pas simple à mettre en œuvre sur le BNP(1-76) en échantillons sanguins. En effet, les seuls exemples montrés sont réalisés, non sur des sérum réels, mais sur des gammes étalons obtenues à l'aide d'un peptide synthétique, le peptide BNP(47-64), sous-séquence du BNP(1-76). Pour pallier cet inconvénient, un système automatisé hautement sophistiqué s'est avéré, depuis, nécessaire.

L'article Hunt et al. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 214(3), 1995, pp. 1175-1183 décrit un dosage RIA de type compétitif du BNP(1-76) sur plasmas de patients souffrant d'insuffisance cardiaque, faisant intervenir un antisérum dirigé contre le fragment N-terminal du proBNP(1-13). L'article montre précisément que, chez des insuffisants cardiaques, le taux de BNP(1-76), très bien corrélé à celui du BNP(77-108), est considérablement élevé par rapport au taux observé chez des sujets témoins. Cependant, le protocole décrit pour extraire spécifiquement le seul BNP(1-76) plasmatique est complexe, puisqu'il nécessite une extraction du plasma sur cartouche Sep-pak C18<sup>TM</sup> (Millipore-Waters), suivie d'une chromatographie HPLC. Par ailleurs, cet article souligne que, dans le dosage RIA ainsi mis en œuvre, le proBNP(1-108) ne paraît pas reconnu. Il suggère plutôt que le proBNP(1-108) pourrait être sécrété dans la circulation à partir du tissu cardiaque mais serait ensuite rapidement dégradé en un peptide plus petit, par clivage des acides N-terminaux. Ou encore, selon l'article, le proBNP(1-108) serait présenté d'une façon telle que l'antisérum anti proBNP(1-108) serait incapable de se lier à lui. Enfin, les auteurs suggèrent que le BNP(1-76) (fragment N-terminal du proBNP) pourrait même être un marqueur plus spécifique du dysfonctionnement cardiaque que le BNP(77-108) ou que le fragment N-terminal du proANP.

L'article Karl et al. (*Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1999 ; 59(suppl 230) : 177-181) décrit une méthode de détection du BNP(1-76) similaire à celle de la demande de brevet WO93/24531, mais il ne fournit aucun résultat obtenu sur échantillons de patients.

L'article Schulz et al. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 2001, vol. 61, pp. 33-42, décrit également un dosage radioimmunologique spécifique du BNP(1-76) (fragment N-terminal du proBNP), sans extraction, à l'aide d'un

antisérum dirigé contre les acides aminés 1-21 de ce fragment. Les auteurs confirment l'intérêt du dosage du BNP(1-76) en diagnostic de l'insuffisance cardiaque ventriculaire ainsi que sa bonne corrélation avec le dosage du BNP(77-108). Lors d'une étude des différentes formes circulantes du proBNP(1-108), ils avancent l'hypothèse que le proBNP(1-108) circulerait dans le sang, à la fois sous forme de prohormone intacte et de produits de clivage, BNP(1-76) (fragment N-terminal du proBNP) et BNP(77-108). Cependant rien n'est dit ou suggéré dans l'article concernant une éventuelle activité physiologique du proBNP(1-108) ou un intérêt diagnostique quelconque du proBNP(1-108) en tant que marqueur prédictif ou diagnostique de l'insuffisance cardiaque ventriculaire.

L'article Shimizu et al. *Clinica Chimica Acta*, 2002, vol. 316, pp. 129-135, présente une étude sur la dégradation du BNP humain dans le sang et les formes moléculaires circulantes de BNP immunoréactif dans le plasma d'insuffisants cardiaques. Il observe dans le plasma de ces derniers la présence de deux formes de BNP immunoréactif : un BNP de haut poids moléculaire (de 36 KD, qui pourrait correspondre à un trimère du proBNP(1-108)) et un BNP de bas poids moléculaire. Ce dernier correspond à la présence simultanée d'une forme de produit de dégradation du BNP-32 ayant perdu la sérine et la proline N-terminales (c'est la des-SerPro-BNP (BNP3-32)) de la forme hormonale du BNP-32 (ici appelée BNP(1-32)). Le proBNP(1-108) et le BNP hormonal (BNP-32, BNP(1-32) ou encore BNP(77-108)) sont donc sécrétés par le cœur dans le sang. Néanmoins, les auteurs semblent suggérer que le proBNP(1-108) sous sa forme oligomérisée (trimère) est présent en concentration proche de celle du BNP(77-108) circulant, mais ils ne la mesurent pas. Par voie de conséquence, la corrélation de la concentration du proBNP(1-108) avec l'état clinique des patients n'est pas étudiée. Il s'ensuit que l'intérêt diagnostique ou pronostique du proBNP(1-108) sérique n'y est pas démontré. Il n'est pas non plus suggéré qu'il soit possible de doser ce dernier en routine.

Par ailleurs, un certain nombre d'épitopes présents sur le proBNP(1-108) sont connus. C'est ainsi que, dans le cadre de la détection du BNP(77-108), l'épitope de séquence S<sub>77</sub>PKMVQGSGC<sub>86</sub> (SEQ ID N° 105)

correspondant aux 10 acides aminés N-terminaux (AA 1-10) du BNP(77-108) est décrit dans la demande WO 97/32900. Similairement, dans le cadre de la détection du BNP(1-76) (fragment N-terminal du proBNP), l'épitope de séquence R<sub>65</sub>KMVLVTLRAPR<sub>76</sub> (SEQ ID N° 106) correspondant aux 12 acides aminés C-terminaux du BNP(1-76) (fragment N-terminal du proBNP) est décrit dans la demande WO 00/35951, et la séquence voisine H<sub>64</sub>RKMVLVTLRAPR<sub>76</sub> (SEQ ID N° 107) est décrite dans la demande WO 00/45176. Toutefois, aucune de ces demandes de brevet ne décrit ou ne suggère l'existence d'un épitope intermédiaire ou hybride entre ces séquences.

Il existe donc toujours un besoin, dans le cadre du diagnostic précoce de l'insuffisance cardiaque, de disposer d'une méthode qui évite les inconvénients de l'art antérieur. En particulier, il existe un besoin de disposer d'une méthode simple, utilisable en routine et fiable, qui évite les inconvénients de la détection du BNP(77-108), molécule peu abondante et peu stable, tout en évitant les extractions complexes, occasionnées par le dosage d'autres formes moléculaires de BNP, et qui peuvent aller éventuellement jusqu'à requérir une automatisation sophistiquée.

Les auteurs de la présente invention se sont donc attachés à mettre au point une méthode alternative pour résoudre le problème posé. Au cœur de la présente invention se trouve la découverte inattendue, faite par les inventeurs, d'un épitope aux propriétés uniques situé dans le domaine de la séquence charnière Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGSG<sub>85</sub> (SEQ ID N° 4) ou de la séquence Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>84</sub> (SEQ ID N° 108) du proBNP(1-108) et comprenant au minimum la séquence RAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>P (SEQ ID N° 5).

En effet, lors d'une immunisation pratiquée chez le lapin avec un peptide de la région charnière du proBNP(1-108), de séquence CY<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGSG<sub>85</sub> (SEQ ID N° 16) ou encore avec le peptide de séquence CY<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>84</sub> (SEQ ID N° 109), ils ont découvert de façon surprenante que l'antisérum obtenu non seulement contenait des anticorps qui reconnaissaient de façon spécifique ledit peptide de la région charnière sans substantiellement reconnaître les formes du BNP(1-76) et du BNP(77-108), mais en plus avait la capacité de reconnaître le proBNP(1-108) circulant.

Les auteurs de la présente invention ont, en outre, montré pour la première fois que le proBNP(1-108) circulant était effectivement un marqueur prédictif de l'insuffisance cardiaque et qu'il était présent en concentration significativement plus élevée chez les insuffisants cardiaques que chez des sujets témoins sains.

Les auteurs ont également découvert qu'une autre façon d'obtenir ce type d'anticorps est d'immuniser des animaux à l'aide de la molécule complète de proBNP(1-108). En effet, les auteurs ont trouvé que l'immunisation avec la molécule complète de proBNP(1-108) permettait d'induire l'apparition d'anticorps reconnaissant de façon spécifique une séquence de la région charnière.

De plus, les auteurs de la présente invention ont démontré que l'épitope minimum reconnu par les anticorps selon l'invention avait la séquence suivante : RAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>P. Ils ont montré, en outre, qu'une bonne façon d'obtenir les anticorps objets de la présente invention est d'immuniser des animaux avec un peptide de formule générale:

$$a_1 - X_1 - \text{RAPRSP} - X_2 - a_2 \quad (I)$$

où

20 a<sub>1</sub> peut être H ou représenter une fonction ou un groupement chimique choisi parmi une fonction thiol, alcool, aminoxy, amine primaire ou secondaire, un groupement amino-carboxyle, un groupement biotinyle et un groupement acétyle,

25 X<sub>1</sub> représente une séquence peptidique de 0 à 3 acides aminés, issue de la séquence naturelle du proBNP(1-108) ou non,

X<sub>2</sub> représente une séquence peptidique de 0 à 8 acides aminés, de préférence 7 acides aminés, issue de la séquence naturelle du proBNP(1-108) ou non,

a<sub>2</sub> peut représenter une fonction OH, NH<sub>2</sub> ou un groupement alcoxyle.

30 De même, les auteurs de la présente invention ont montré qu'il était possible d'obtenir les mêmes anticorps spécifiques par immunisation d'un animal avec un peptide comprenant la séquence RAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>P ou avec un peptide de formule :

$$X - Y_{70} - \text{TLRAPR}_{76}S_{77}\text{PKMVQGSG}_{85} - Z \quad (II)$$

où X peut être H ou représenter soit un groupement acétyle, soit 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z peut représenter une fonction OH, ou 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108).

5 De plus, les auteurs de la présente invention ont montré qu'il était possible d'obtenir les mêmes anticorps spécifiques par immunisation d'un animal avec un peptide de formule :

X-Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGGS<sub>84</sub>- Z (III)

10 où X peut être H ou représenter soit un groupement acétyle, soit 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z peut représenter une fonction OH, ou 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108).

15 Les auteurs de la présente invention ont de plus mis au point une méthode simple et fiable de diagnostic précoce de l'insuffisance cardiaque reposant sur la détection du proBNP(1-108) circulant dans le sang et une trousse permettant la mise en œuvre de cette détection du proBNP(1-108) circulant.

La présente invention a donc pour objet un anticorps anti proBNP(1-108) caractérisé en ce que, d'une part, il reconnaît de façon spécifique la 20 séquence Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGSG<sub>85</sub> du proBNP(1-108) et ne reconnaît substantiellement pas le BNP(1-76) ni le BNP(77-108), et, d'autre part, a la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains.

25 La présente invention a de plus pour objet un anticorps anti proBNP(1-108) caractérisé en ce que, d'une part, il reconnaît de façon spécifique la séquence Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGGS<sub>84</sub> du proBNP(1-108) et ne reconnaît substantiellement pas le BNP(1-76) ni le BNP(77-108), et d'autre part, a la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains.

30 La présente invention a plus particulièrement pour objet un anticorps anti proBNP(1-108) caractérisé en ce que, d'une part, il reconnaît de façon spécifique la séquence RAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>P du proBNP(1-108) et ne reconnaît substantiellement pas le BNP(1-76) ni le BNP(77-108), et, d'autre part, a la

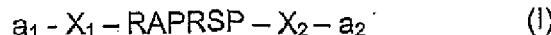
capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains.

La présente invention a en outre pour objet un procédé d'obtention d'anticorps anti proBNP(1-108) reconnaissant de façon spécifique la séquence 5  $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGSG_{85}$ , la séquence  $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}$  et/ou la séquence  $RAPR_{76}S_{77}P$  du proBNP(1-108) à l'exclusion substantielle du BNP(1-76) et du BNP(77-108), et ayant la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains caractérisé en ce que l'on immunise un animal avec la 10 molécule entière de proBNP(1-108), puis en ce que l'on épouse, à l'aide du peptide BNP(77-108) et/ou du peptide BNP(1-76), l'antisérum obtenu.

Par « épuisement d'un antisérum » obtenu contre un antigène spécifique donné (l'antigène immunisant), on entend l'élimination d'anticorps non spécifiques, potentiellement présents dans cet antisérum, par la mise en 15 contact et l'incubation dudit antisérum avec des « antigènes non spécifiques », c'est à dire des antigènes différents de l'antigène immunisant, puis séparation et élimination immunologiques des anticorps ayant réagi avec lesdits « antigènes non spécifiques » et récupération de l'antisérum ainsi épuisé (c'est-à-dire appauvri en anticorps non spécifiques). L'épuisement sert 20 classiquement à rendre spécifique un antisérum dirigé contre un antigène donné.

Dans le présent cas, un antisérum reconnaissant la séquence  $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGSG_{85}$ , et/ou la séquence  $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}$  ou la séquence  $RAPR_{76}S_{77}P$  du proBNP(1-108) peut être épuisé, c'est à dire rendu spécifique, par mise en contact avec le 25 BNP(77-108) et/ou le BNP(1-76) susnommés, ces derniers pouvant, par exemple, être immobilisés en phase solide et servir de support à une chromatographie par immunoadsorption selon des techniques conventionnelles, connues de l'homme du métier. L'anticorps présent 30 finalement dans l'antisérum épuisé est ici un anticorps polyclonal monospécifique.

La présente invention a encore pour objet un peptide de formule :



où

a<sub>1</sub> peut être H ou représenter une fonction ou un groupement chimique choisi parmi une fonction thiol, alcool, aminoxy, amine primaire ou secondaire, un groupement amino-carboxyle, un groupement biotinyle et un groupement acétyle,

X<sub>1</sub> représente une séquence peptidique de 0 à 3 acides aminés, issue de la séquence naturelle du proBNP(1-108) ou non,

X<sub>2</sub> représente une séquence peptidique de 0 à 8 acides aminés, de préférence 7 acides aminés, issue de la séquence naturelle du proBNP(1-108)

ou non,

a<sub>2</sub> peut représenter une fonction OH, NH<sub>2</sub> ou un groupement alcoxyle.

La présente invention a encore pour objet un peptide de formule :

X-Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGSG<sub>85</sub>-Z (II)

où X peut être H, ou représenter soit un groupement acétyle, soit 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z peut représenter une fonction OH, ou 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108).

La présente invention a de plus pour objet un peptide de formule :

X-Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>84</sub>-Z (III)

où X peut être H, ou représenter soit un groupement acétyle, soit 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z peut représenter une fonction OH, ou 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108).

A noter que dans les formules (II) et (III) ci-dessus, le numéro des acides aminés (Y<sub>70</sub>, R<sub>76</sub>, S<sub>77</sub>, S<sub>84</sub> ou G<sub>85</sub>) a été maintenu simplement pour aider à la compréhension de l'invention et au repérage de cette séquence vis-à-vis de la séquence proBNP(1-108). Il en est de même des autres séquences présentées avec des numéros dans cette demande.

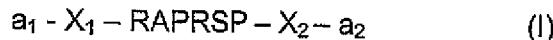
L'invention concerne aussi tout peptide contenant la séquence X-Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGSG<sub>85</sub>-Z (II) ou la séquence X-Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>84</sub>-Z (III), ou l'une des séquences (II) ou (III) susdite sous forme substituée, de façon conservatrice ou non, en l'un

quelconque des acides aminés de la position 70 à la position 85 ou 84, respectivement, à condition qu'elle garde intacte (en particulier non substituée) la portion RAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>P.

Il s'agit donc d'un peptide comprenant une séquence dérivée de la 5 séquence X-Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGSG<sub>85</sub>-Z (II) ou de la séquence X-Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>84</sub>-Z (III) par substitution d'un ou plusieurs parmi les acides aminés Y<sub>70</sub>, T<sub>71</sub>, L<sub>72</sub>, K<sub>73</sub>, M<sub>80</sub>, V<sub>81</sub>, Q<sub>82</sub>, G<sub>83</sub>, S<sub>84</sub> et G<sub>85</sub>, avec X pouvant être absent ou représenter soit une fonction NH<sub>2</sub>, soit 1 à 3 acides 10 aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z pouvant être absent ou représenter soit une fonction OH, soit 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108).

L'invention concerne enfin le peptide de séquence Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGSG<sub>85</sub>, et le peptide de séquence Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>84</sub>.

15 L'invention a encore pour objet un procédé d'obtention d'anticorps anti proBNP(1-108) reconnaissant de façon spécifique la séquence Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGSG<sub>85</sub>, Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>84</sub> et/ou la séquence RAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>P du proBNP(1-108) à l'exclusion substantielle du BNP(1-76) et du BNP(77-108), et ayant la capacité de reconnaître spécifiquement le 20 proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains caractérisé en ce que l'on immunise un animal avec un peptide de formule :



où a<sub>1</sub>, X<sub>1</sub>, X<sub>2</sub>, et a<sub>2</sub> ont la même signification que ci-dessus, 25 et, éventuellement, en ce que l'on épouse, à l'aide du peptide BNP(77-108) et/ou du peptide BNP(1-76), l'antisérum obtenu. L'anticorps ainsi obtenu est un anticorps monospécifique.

L'invention a encore pour objet un procédé d'obtention d'anticorps anti proBNP(1-108) reconnaissant de façon spécifique la séquence Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGSG<sub>85</sub>, Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>84</sub> et/ou la 30 séquence RAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>P du proBNP(1-108) à l'exclusion substantielle du BNP(1-76) et du BNP(77-108), et ayant la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques

humains caractérisé en ce que l'on immunise un animal avec un peptide de formule :

X-Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGSG<sub>85</sub>-Z (II)

ou avec un peptide de formule X-Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>84</sub>-Z (III),

5 où X et Z sont tels que définis ci-dessus et, éventuellement, en ce que l'on épouse, à l'aide du peptide BNP(77-108) et/ou du peptide BNP(1-76), l'antisérum obtenu.

L'invention a encore pour objet un procédé d'obtention d'hybridome sécréteur d'anticorps anti proBNP(1-108) reconnaissant de façon spécifique la 10 séquence Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGSG<sub>85</sub> Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>84</sub> et/ou la séquence RAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>P du proBNP(1-108) à l'exclusion substantielle du BNP(1-76) et du BNP(77-108), et ayant la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains caractérisé en ce que l'on immunise un animal avec un 15 peptide de formule :

X-Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGSG<sub>85</sub>-Z (II)

ou avec un peptide de formule X-Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>84</sub>-Z (III),

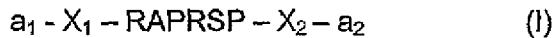
sous forme substituée, de façon conservatrice ou non, à condition qu'elle garde intacte (en particulier non substituée) la portion RAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>P, où X et Z 20 sont tels que définis ci-dessus et, éventuellement, en ce que l'on épouse, à l'aide du peptide BNP(77-108) et/ou du peptide BNP(1-76), l'antisérum obtenu.

L'invention a encore pour objet un procédé d'obtention d'anticorps anti proBNP(1-108) reconnaissant de façon spécifique la séquence Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGSG<sub>85</sub>, Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>84</sub> et/ou la 25 séquence RAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>P du proBNP(1-108) à l'exclusion substantielle des peptides BNP(1-76) et BNP(77-108), et ayant la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains caractérisé en ce que l'on immunise un animal avec le 30 peptide de séquence Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGSG<sub>85</sub>, ou le peptide de séquence Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>84</sub> et, éventuellement, en ce que l'on épouse, à l'aide du peptide BNP(77-108) et/ou du peptide BNP(1-76), l'antisérum obtenu.

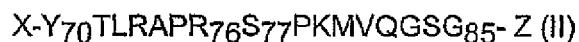
L'invention a encore pour objet un procédé d'obtention d'hybridome

sécréteur d'anticorps anti proBNP(1-108) reconnaissant de façon spécifique la séquence  $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGSG_{85}$ , la séquence  $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}$  et/ou la séquence  $RAPR_{76}S_{77}P$  du proBNP(1-108) à l'exclusion substantielle du BNP(1-76) et du BNP(77-108), et ayant la 5 capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains caractérisé en ce que :

- on immunise un animal avec un peptide choisi parmi les peptides de formules suivantes :

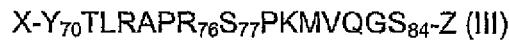


10 où  $a_1$ ,  $X_1$ ,  $X_2$ , et  $a_2$  ont la même signification que ci-dessus,

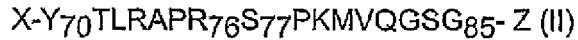


où X et Z ont la même signification que ci-dessus,

15



où X et Z ont la même signification que ci-dessus,



20

sous forme substituée, de façon conservatrice ou non, à condition qu'elle garde intacte (en particulier non substituée) la portion  $RAPR_{76}S_{77}P$ ,

où X et Z ont la même signification que ci-dessus,



25

sous forme substituée, de façon conservatrice ou non, à condition qu'elle garde intacte (en particulier non substituée) la portion  $RAPR_{76}S_{77}P$ ,

où X et Z ont la même signification que ci-dessus,

30

$Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGSG_{85}$ , et

$Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}$

- on prélève des lymphocytes sécréteurs d'immunoglobulines de cet

animal, et en ce que

- on procède à une fusion des lymphocytes avec des cellules de myélome pour obtenir au moins un hybridome sécréteur d'immunoglobulines.

Ceci correspond à la technique classique d'obtention des hybridomes 5 dont le principe est décrit dans Köhler et Milstein, (1975) *Nature* (London), 256 :495-497.

L'invention a encore pour objet un tel hybridome et l'anticorps anti proBNP(1-108) monoclonal sécrété par ledit hybridome.

La présente invention a en outre pour objet une méthode de diagnostic 10 *in vitro* de l'insuffisance cardiaque chez un humain comprenant la mise en contact d'un échantillon biologique, de préférence de sang, plasma ou sérum, avec un anticorps anti proBNP(1-108) reconnaissant de façon spécifique la séquence  $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGSG_{85}$ , la séquence  $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}$  et/ou la séquence  $RAPR_{76}S_{77}P$  du proBNP(1- 15 108) à l'exclusion substantielle du BNP(1-76) et du BNP(77-108), et ayant la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains, et la détection du proBNP(1-108) dans l'échantillon.

L'invention fournit de manière générale une méthode de diagnostic *in* 20 *vitro* de l'insuffisance cardiaque chez un humain comprenant :

a) la mise en contact d'un échantillon biologique, de préférence de sang, plasma ou sérum, avec un anticorps anti proBNP(1-108) reconnaissant de façon spécifique la séquence  $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGSG_{85}$ , la séquence  $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}$  et/ou la séquence  $RAPR_{76}S_{77}P$  du proBNP(1- 25 108) à l'exclusion substantielle du BNP(1-76) et du BNP(77-108), et ayant la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains,

b) l'incubation du mélange dans des conditions permettant la formation de complexes antigènes-anticorps ; et

c) la révélation des complexes antigènes-anticorps formés, éventuellement à l'aide d'un anticorps de détection, marqué, capable de se lier spécifiquement au proBNP(1-108) présent dans le premier complexe, ou à l'aide d'un antigène de détection, marqué, capable de se lier à l'anticorps dirigé 30

contre ledit proBNP(1-108) présent dans le premier complexe.

En particulier, l'invention fournit une méthode de diagnostic de l'insuffisance cardiaque qui comprend, en plus des étapes a, b et c susdites, une étape d) de corrélation de la quantité des complexes antigènes-anticorps révélés à l'état clinique du sujet.

La présente invention a de plus pour objet une trousse de détection du proBNP(1-108) dans un échantillon biologique, notamment dans un échantillon de sang, plasma ou sérum, contenant au moins un anticorps anti proBNP(1-108) reconnaissant de façon spécifique la séquence  $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGSG_{85}$ , la séquence  $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}$  et/ou la séquence  $RAPR_{76}S_{77}P$  du proBNP(1-108) à l'exclusion substantielle du BNP(1-76) et du BNP(77-108), et ayant la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains.

L'invention vise enfin une trousse de détection du proBNP(1-108) dans un échantillon biologique, notamment dans un échantillon de sang, plasma ou sérum, contenant, comme étalon et/ou témoin, un composé contenant au moins un peptide choisi dans le groupe de peptides de formules suivantes :

20  $a_1 - X_1 - RAPRSP - X_2 - a_2$  (I)

où  $a_1$ ,  $X_1$ ,  $X_2$ , et  $a_2$  ont la même signification que ci-dessus,

X- $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGSG_{85}$ -Z (II)

où X et Z ont la même signification que ci-dessus,

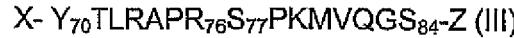
25 X- $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGSG_{85}$ -Z (II)

sous forme substituée, de façon conservatrice ou non, à condition qu'elle garde intacte (en particulier non substituée) la portion  $RAPR_{76}S_{77}P$ ,

où X et Z ont la même signification que ci-dessus,

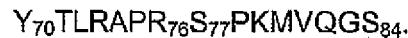
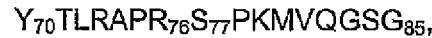
30 X- $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}$ -Z (III),

où X et Z ont la même signification que ci-dessus,



sous forme substituée, de façon conservatrice ou non, à condition qu'elle garde intacte (en particulier non substituée) la portion  $\text{RAPR}_{76} \text{S}_{77} \text{P}$ , où X et Z ont la même signification que ci-dessus,

5



### *Définitions*

10 Dans le contexte de l'invention, un « échantillon biologique » ou encore un « échantillon de fluide biologique » est de préférence constitué par un liquide biologique, tel que du sang, plasma, sérum, de l'urine, du liquide céphalorachidien, de la salive, etc...

15 Par « insuffisance cardiaque », on entend l'état pathologique dans lequel une anomalie de la fonction cardiaque est responsable de l'incapacité du cœur à pomper le sang de façon suffisante pour répondre aux besoins métaboliques de l'organisme et/ou dans lequel le cœur pourvoit aux besoins mais avec des pressions de remplissage anormalement élevées. Il peut notamment s'agir d'une insuffisance ventriculaire droite et/ou gauche.

20 Le terme « *anticorps* » se réfère à tout anticorps entier ou fragment fonctionnel d'un anticorps (obtenu par génie génétique ou non), comprenant, ou consistant en, au moins un site de combinaison antigénique, permettant à l'anticorps de se lier à au moins un déterminant antigénique d'un composé antigénique. A titre d'exemple de fragments d'anticorps on peut citer les fragments Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> ainsi que les fragments variables à simple chaîne (chaînes scFv).

30 Les anticorps anti proBNP(1-108) selon l'invention peuvent être de type polyclonal ou monoclonal. Un anticorps polyclonal anti proBNP(1-108) selon l'invention peut, entre autres, être obtenu par immunisation d'un animal tel qu'un lapin, une souris, etc.. à l'aide du proBNP(1-108) entier, prélèvement puis épuisement de l'antisérum obtenu sur, par exemple, un immunoadsorbant contenant du BNP(77-108) et/ou du BNP(1-76) selon des méthodes en soi connues de l'homme du métier. Un anticorps monoclonal anti proBNP(1-108)

selon l'invention peut, entre autres, être obtenu par la méthode classique de Köhler et Milstein (Nature (London), 256 : 495- 497 (1975)).

La production d'anticorps monoclonaux ou de sérums polyclonaux monospécifiques, ou d'anticorps obtenus par criblage de banques 5 génomiques, utiles dans le cadre de l'invention relève de techniques conventionnelles, qui sont détaillées plus loin.

Par « anticorps de capture », on entend un anticorps ou une partie d'anticorps, de préférence fixé sur une phase solide, qui est capable de retenir l'antigène proBNP(1-108) présent dans un échantillon biologique, par liaison 10 affine.

La présence de l'antigène dans l'échantillon biologique est révélée par des « moyens de détection ». S'agissant de la détection de l'antigène, l'invention prévoit notamment une détection à l'aide d'au moins un « anticorps de détection ». Un tel anticorps de détection, marqué, est capable de se lier à 15 l'antigène capturé, par liaison affine, en reconnaissant un site épitopique, différent de celui reconnu par l'anticorps de capture.

Le terme « marqué » se réfère aussi bien à un marquage direct (par le biais d'enzymes, radioisotopes, fluorochromes, composés luminescents, etc) qu'à un marquage indirect (par exemple, par le biais d'anticorps eux-mêmes marqués de manière directe ou à l'aide de réactifs d'une « paire d'affinité » marquée, telle que, mais non exclusivement, la paire avidine marquée-biotine, etc.).

Par « fragment antigénique », on entend toute partie du proBNP(1-108) capable d'induire la synthèse d'anticorps substantiellement spécifique du seul 25 proBNP(1-108) chez un animal immunisé.

Conformément à la présente invention, un « fragment antigénique » contient au moins le « site épitopique » ou épitope RAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>P. Un « site épitopique » ou « épitope » est une séquence d'acides aminés qui est reconnue par au moins un anticorps et permet la liaison spécifique de celui-ci.

Le terme « anticorps polyclonal monospécifique », s'applique à tout anticorps polyclonal présentant une spécificité pour un seul épitope. Ceci signifie que l'anticorps est capable de lier une séquence d'acides aminés de la séquence du proBNP(1-108) contenant les acides aminés comprenant 30

l'épitope, mais est incapable de lier une séquence d'acides aminés de la séquence du proBNP(1-108) qui ne contient pas les acides aminés comprenant l'épitope.

Le terme « spécifiquement », quand il se réfère à une reconnaissance ou une liaison spécifique d'un anticorps pour un antigène, signifie que l'anticorps interagit avec l'antigène sans interaction substantielle avec d'autres antigènes, ou si l'on parle de reconnaissance « spécifique » avec un épitope, par reconnaissance quasi-exclusive de cet épitope. Des constantes d'association supérieures à  $10^8 \text{ L.mol}^{-1}$  sont préférables.

Par « substitution conservatrice », on entend notamment la substitution d'un acide aminé d'une classe par un acide aminé de la même classe, substitution qui ne modifie pas significativement l'immunoréactivité du peptide obtenu par rapport à celle du peptide d'origine. Parmi les différentes classes d'acides aminés on distingue généralement les acides aminés à chaîne latérale polaire (tel que l'asparagine, la glutamine, la sérine, la thréonine et la tyrosine), les acides aminés à chaîne latérale non polaire (tel que la glycine, l'alanine, la valine, la leucine, l'isoleucine, la phénylalanine, la méthionine, le tryptophane et la cystéine), les acides aminés à chaîne latérale basique (tel que la lysine, l'arginine et l'histidine), et les acides aminés à chaîne latérale acide (tel que l'acide aspartique et l'acide glutamique).

Par « substitution non conservatrice », on entend tout autre type de substitution, qui ne modifie pas significativement l'immunoréactivité du peptide obtenu par rapport à celle du peptide d'origine.

Par l'expression « ne reconnaît substantiellement pas le BNP(1-76) ni le BNP(77-108) », on entend que l'anticorps visé par l'invention présente une réaction croisée avec le BNP(1-76) ou le BNP(77-108) inférieure à 20%, particulièrement inférieure à 10%, de façon préférée inférieure à 5%. La détermination du pourcentage de la réaction croisée se fait selon des méthodes en soi connues de l'homme du métier, par exemple, celle illustrée dans l'exemple 5.

La non-reconnaissance « substantielle » des peptides BNP(1-76) et BNP(77-108) correspond de préférence à une absence ou quasi-absence de réaction des anticorps de l'invention avec ces peptides.

Par l'expression « à l'exclusion substantielle du BNP(1-76) et du BNP(77-108) », on entend que l'anticorps « ne reconnaît substantiellement pas le BNP(1-76) ni le BNP(77-108) » au sens vu plus haut.

5

#### *Production d'anticorps spécifiques*

Les anticorps utilisés dans la présente invention sont des anticorps spécifiques de l'antigène, et, pour cette raison, sont des anticorps monoclonaux ou des anticorps polyclonaux monospécifiques, c'est à dire qu'ils ne reconnaissent spécifiquement qu'un épitope.

10

Les anticorps monoclonaux peuvent être obtenus selon la méthode classique de fusion lymphocytaire et culture d'hybridomes décrite par Köhler et Milstein, *Nature*, 1975, 256 : 495-497. D'autres méthodes de préparation d'anticorps monoclonaux sont également connues (Harlow et al, ed., 1988 « *Antibodies : a laboratory manual* »). Les anticorps monoclonaux peuvent être préparés en immunisant un mammifère (par exemple une souris, un rat, un lapin, voire un être humain, etc..) et en utilisant la technique de fusion lymphocytaire conduisant à des hybridomes (Köhler et Milstein, 1975).

15

Des techniques alternatives à cette technique usuelle existent. On peut, par exemple, produire des anticorps monoclonaux par expression d'un acide nucléique cloné à partir d'un hybridome. On peut également produire des anticorps par la technique d'expression sur phage (« *phage display* »), en introduisant des ADNc d'anticorps dans des vecteurs, qui sont typiquement des phages filamenteux qui présentent des banques de gènes V à la surface du phage (par exemple fUSE5 pour *E. coli*, Scott, J.K. et Smith, G.P., *Science*, 1990, 249 :386-390). Des protocoles de construction de ces banques d'anticorps sont décrits dans Marks et al, 1991, *J. Mol. Biol.*, 222 :581-597).

20

Les anticorps polyclonaux peuvent être obtenus à partir du sérum d'un animal immunisé contre un antigène de nature peptidique selon les modes opératoires usuels. Les anticorps polyclonaux ainsi obtenus pourront, si besoin est, et par épuisement avec du BNP(77-108) et du BNP1-76, selon des techniques en soi connues de l'homme du métier comme, par exemple, l'immunoadsorption sur colonne, être rendus monospécifiques de la séquence  $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGSG_{85}$ , de la séquence  $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}$

et/ou d'un peptide comprenant la séquence RAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>P, assurant ainsi la spécificité vis à vis du proBNP(1-108), à l'exclusion substantielle du BNP(1-76) et du BNP(77-108).

5

#### *Anticorps de capture et/ou de détection*

En technique sandwich, l'anticorps de capture est choisi de manière à ce qu'il reconnaisse spécifiquement un épitope, sur l'antigène naturel du patient, tandis que l'anticorps de détection est choisi, de préférence, mais non obligatoirement de manière à ce qu'il reconnaisse spécifiquement un autre épitope, sur l'antigène naturel du patient.

10

L'échantillon biologique peut être éventuellement traité dans une étape préalable, ou mis directement en présence d'au moins un anticorps de capture dans des conditions favorisant l'exposition de l'épitope à détecter.

Le procédé de diagnostic selon l'invention peut être réalisé selon divers formats bien connus de l'homme du métier : en phase solide ou en phase homogène ; en un temps ou en deux temps ; en méthode sandwich ou en méthode compétitive, à titre d'exemples non limitatifs.

15

Selon un mode de réalisation préféré, l'anticorps de capture est immobilisé sur une phase solide. On peut utiliser, à titre d'exemples non limitatifs de phase solide, des microplaques, en particulier des microplaques de polystyrène, telles que celles commercialisées par la société Nunc, Danemark. On peut également utiliser des particules ou des billes solides, des billes paramagnétiques, telles que celles fournies par Dynal ou Merck-Eurolab (France) (sous la marque Estapor<sup>TM</sup>), ou encore des tubes à essai en polystyrène ou polypropylène, etc...

20

Un format d'immunoessai de type sandwich entre deux anticorps (de capture et de détection) est particulièrement avantageux pour la détection des antigènes présents dans l'échantillon biologique.

25

Un format d'immunoessai de détection des antigènes par compétition est également possible. D'autres modalités d'immunoessais sont encore envisageables et bien connues de l'homme du métier.

Dosages ELISA, radioimmunoessais, ou toute autre technique de détection peuvent être mis en œuvre pour révéler la présence des complexes

antigènes-anticorps formés.

### Trousses

Les trousse et réactifs utiles pour la détection du proBNP(1-108) dans un échantillon de fluide biologique, conformément au procédé de l'invention, peuvent être fournis pour une mise en pratique de l'invention facile et applicable à de nombreux échantillons biologiques.

Des trousse de détection du proBNP(1-108) dans un échantillon biologique peuvent contenir au moins un anticorps tel que défini précédemment. D'autres trousse, contenant comme étalon et/ou témoin, au moins un peptide de formule (I), (II) ou un peptide substitué tel que défini précédemment, peuvent également être utiles à la mise en œuvre de l'invention.

Un autre objet particulier de l'invention est donc une trousse de détection du proBNP(1-108) dans un échantillon de fluide biologique, comprenant :

- au moins un anticorps anti proBNP(1-108) reconnaissant de façon spécifique la séquence  $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGSG_{85}$ , la séquence  $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}$  et/ou la séquence  $RAPR_{76}S_{77}P$  du proBNP(1-108) à l'exclusion substantielle du BNP(1-76) et du BNP(77-108), et ayant la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains, et qui est de préférence un anticorps de capture dudit proBNP(1-108) présent dans l'échantillon biologique, et
- un conjugué marqué capable de se lier spécifiquement aux complexes antigènes anticorps formés.

Comme cela est décrit ci-dessus, l'anticorps de capture peut être présenté de manière avantageuse sous une forme immobilisée sur une phase solide, telle qu'une microplaqué, par exemple, mais non exclusivement.

Une trousse préférée comprend au moins :

- un anticorps de capture anti proBNP(1-108) reconnaissant de façon spécifique la séquence  $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGSG_{85}$ , la séquence  $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}$ , et/ou la séquence  $RAPR_{76}S_{77}P$  du proBNP(1-

108) à l'exclusion substantielle du BNP(1-76) et du BNP(77-108), et ayant la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains, ledit anticorps de capture étant immobilisé sur une phase solide ; et

5 - un anticorps de détection, marqué, dirigé contre un autre épitope, intact, du proBNP(1-108), ou éventuellement,

- un antigène de détection, marqué, qui est un peptide du proBNP(1-108) ou le proBNP(1-108) lui-même.

10 Selon un mode de réalisation particulier, une trousse de détection du proBNP(1-108) dans un échantillon biologique, peut contenir :

- dans un récipient, au moins un anticorps tel que défini précédemment ;
- dans un autre récipient au moins un peptide tel que défini précédemment, utile notamment comme étalon et/ou témoin.

15 Les figures et exemples suivants illustrent l'invention sans en limiter la portée.

#### LEGENDE DES FIGURES :

La figure 1 représente la réactivité des anticorps polyclonaux du lapin # 046 805 purifiés sur protéine A-sépharose avec le proBNP (1-108), le fragment BNP(1-76), le BNP(77-108), ou la GST (Glutathion-S-transférase, utilisée comme protéine témoin) adsorbés sur microplaqué à 0,25 µg/ml.

20 La figure 2 représente la réactivité des anticorps polyclonaux du filtrat du lapin # 046 805 obtenus après épuisement sur résine BNP-K<sub>3</sub>-NHS-sépharose. Les anticorps polyclonaux sont préparés sous forme de gammes de dilutions de 2 à 20 µg/ml, puis testés sur des cupules revêtues de polypeptide proBNP(1-108), BNP(1-76) ou BNP(77-108) adsorbé à 0,25 µg/ml.

25 La figure 3 représente la réactivité des anticorps polyclonaux du filtrat du lapin # 046 832 obtenus après épuisement sur résine BNP-K<sub>3</sub>-NHS-sépharose. Les anticorps polyclonaux sont préparés sous forme de gammes de dilutions de 5 à 20 µg/ml, puis testés sur des cupules revêtues de polypeptide proBNP(1-108), BNP(1-76) ou BNP(77-108) adsorbé à 0,25 µg/ml.

30 La figure 4 représente la réactivité de l'éluat du sérum polyclonal du

lapin # 046 805 obtenu après épuisement sur résine BNP-K<sub>3</sub>-NHS-sépharose. Les anticorps polyclonaux sont préparés sous forme de gammes de dilutions de 2 à 20 µg/ml, puis testés sur des cupules revêtues de polypeptide proBNP(1-108), BNP(1-76) ou BNP(77-108) adsorbé à 0,25 µg/ml.

5 La figure 5 représente la réactivité de l'éluat du sérum polyclonal du lapin # 046 832 obtenu après épuisement sur résine BNP-K<sub>3</sub>-NHS-sépharose. Les anticorps polyclonaux sont préparés sous forme de gammes de dilutions de 5 à 20 µg/ml, puis testés sur des cupules revêtues de polypeptide proBNP(1-108), BNP(1-76) ou BNP(77-108) adsorbé à 0,25 µg/ml.

10 La figure 6 représente une analyse épitopique à l'aide de la technique spot du sérum polyclonal du lapin # 046 805 avant épuisement. (Pour cet exemple, le bruit de fond est de 30,4 ± 5,93 unités d'intensité relatives.)

15 La figure 7 représente une analyse épitopique à l'aide de la technique spot du sérum polyclonal du lapin # 046 805 après épuisement sur résine BNP-K<sub>3</sub>-NHS-sépharose. (Pour cet exemple, le bruit de fond est de 31,3 ± 6,31 unités d'intensité relatives.)

20 La figure 8 représente la réactivité du surnageant de culture de l'hybridome 3D4 dilué au 1/2, testé sur des cupules revêtues soit de proBNP(1-108), soit de BNP(1-76), soit de BNP(77-108), soit de peptide YTLRAPRSPKMVQGSG (C13P30), adsorbé à 1 µg/ml.

25 La figure 9 montre une photographie du gel d'acrylamide à 16% dans lequel on a fait migrer chaque protéine (1 µg de protéine par piste). Piste 1 : marqueur de poids moléculaire ; piste 2 : proBNP(1-108)-GST ; piste 3 : GST (protéine témoin négatif) ; piste 4 : BNP(1-76)-GST ; piste 5 : BNP(77-108).

30 La figure 10 montre les résultats du test en western-blot de l'anticorps produit par l'hybridome 3D4 sur le proBNP(1-108)-GST (piste 2), la GST (protéine témoin négatif) (piste 3), le BNP(1-76)-GST (piste 4), et le BNP(77-108) (piste 5), déposés sur gel (1 µg de protéine par gel), puis transférés sur membrane de nitrocellulose.

La figure 11 représente une courbe d'étalonnage du dosage IRMA du proBNP(1-108).

La figure 12 montre les résultats en cpm (coups par minute de

radioactivité) du dosage IRMA du proBNP(1-108) des prélèvements de 14 sujets sains et de 15 patients souffrant d'insuffisance cardiaque.

La figure 13 présente la corrélation entre les concentrations de proBNP(1-108) (en pg/ml) déterminées à l'aide du dosage radioimmunométrique selon l'invention et les concentrations de BNP(1-76) (pg/ml) déterminées, à l'aide du dosage sur l'automate Elecsys® (marque de la société Hoffmann La Roche), des prélèvements de 14 patients souffrant d'insuffisance cardiaque.

La figure 14 représente une courbe d'étalonnage du dosage ELISA du proBNP(1-108) selon l'invention.

La figure 15 représente une évaluation de la réaction croisée, vis à vis du BNP(1-76) et du BNP(77-108), de l'anticorps polyclonal du lapin # 046 805 non épuisé couplé à la biotine, utilisé en sandwich dans le dosage ELISA proBNP(1-108) conjointement à l'anticorps polyclonal anti-BNP(77-108).

La figure 16 représente l'évaluation de la réaction croisée, vis à vis du BNP(1-76) et du BNP(77-108), de l'anticorps polyclonal du lapin # 046 805 non épuisé couplé à la biotine, utilisé en sandwich dans le dosage ELISA proBNP(1-108) conjointement à l'anticorps polyclonal anti-NT-proBNP(1-29).

## 20 EXEMPLES

### **Exemple 1 : synthèse de peptides pour immunisation**

Les peptides synthétiques sont produits par les techniques standards bien connues de l'homme du métier. On peut citer, comme exemple, la synthèse de type Merrifield qui est avantageuse vu sa facilité de mise en œuvre (Merrifield, (1963); R.C.Sheppard (1971) ; Atherton et al. (1989)). Comme synthétiseur automatique, on peut utiliser le synthétiseur "9050 Plus Pep Synthesizer" de Millipore, le "Pioneer" de Perspective, ou le synthétiseur "433A" de ABI. Les peptides peuvent également être obtenus par synthèse en phase homogène.

Les synthèses ci-après ont été réalisées sur un synthétiseur Pioneer, en utilisant la chimie « Fmoc » (9-fluorénylméthoxy carbonyl) : à chaque étape les réactifs (c'est à dire l'acide aminé protégé et les activateurs de couplage

(TBTU(2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium tétrafluoroborate)/HOBt (N-hydroxybenzotriazol)) sont ajoutés en excès (dans un rapport « moles de réactifs /moles de groupes substituables sur la résine » = 5). A la fin de la synthèse, le peptide est séparé de la résine par une solution à base d'acide trifluoroacétique (réactif K). Le peptide est ensuite précipité dans une solution d'éther refroidie, puis purifié par HPLC.

Les inventeurs ont procédé à la synthèse des peptides contenant la séquence d'acides aminés de la région charnière R<sub>76</sub>S<sub>77</sub> suivants :

10	SEQ ID N° 6 :	C-G-R-A-P-R-S-P
	SEQ ID N° 7 :	Acetyl -C-G-R-A-P-R-S-P
	SEQ ID N° 8 :	C-G-R-A-P-R-S-P-K
	SEQ ID N° 9 :	Acetyl -C-G-R-A-P-R-S-P-K
	SEQ ID N° 10 :	C-G-R-A-P-R-S-P-K-M-V
15	SEQ ID N° 11 :	C-G-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G
	SEQ ID N° 12 :	R-A-P-R-S-P-G-C
	SEQ ID N° 13 :	Acetyl -R-A-P-R-S-P-G-C
	SEQ ID N° 14 :	Acetyl -C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K
	SEQ ID N° 15 :	C-H-R-K-M-V-L-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K
20	SEQ ID N° 16 :	C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G (peptide C13P30)
	SEQ ID N° 17 :	C-F-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G
	SEQ ID N° 18 :	C-F-S-I-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G
	SEQ ID N° 19 :	C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-βA
25	SEQ ID N° 20 :	C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-A-T-βA
	SEQ ID N° 21 :	C-F-S-I-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-A-T-βA
	SEQ ID N° 22 :	C-F-S-I-R-A-P-R-S-P-A-L-A-S-G-T-A
	ainsi que	
	SEQ ID N° 109 :	C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S (peptide CN32)
30	SEQ ID N° 110 :	C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K
	SEQ ID N° 111 :	C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V
	SEQ ID N° 112 :	C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q

SEQ ID N° 113 :	C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G
SEQ ID N° 114 :	Acétyl-C-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q
SEQ ID N° 115 :	C-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G
SEQ ID N° 116 :	C-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S
SEQ ID N° 117 :	C-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G
SEQ ID N° 118 :	C-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V
SEQ ID N° 119 :	C-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q
SEQ ID N° 120 :	L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-C
SEQ ID N° 121 :	C-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S
SEQ ID N° 122 :	C-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G

NB :  $\beta$ A signifie béta-alanine.

L'invention a donc aussi pour objet un peptide quelconque choisi dans le groupe constitué par les séquences ci-dessus.

15

### **Exemple 2 : Couplage d'un peptide à une protéine porteuse pour immunisation**

20

On couple le peptide à une protéine porteuse la KLH (Keyhole Lympet Hemocyanin), La thyroglobuline, la BSA (Bovine Serum Albumin, via différentes fonctions (thiol, amine, aldéhyde...) de façon à rendre le peptide plus immunogène. L'agent de couplage utilisé pour lié le peptide à la protéine peut être hétéro- ou homo-bifonctionnel. Les réactifs les plus couramment utilisés sont le BS 3, le sSMCC, le SPDP, le glutaraldéhyde... L'une des techniques de couplage utilisées est celle qui utilise comme agent chimique de couplage le glutaraldéhyde et comme protéine porteuse la KLH. Le couplage de la KLH sur le peptide est réalisé à partir des fonctions amines du peptide (groupement N-terminal et groupement amine porté par la lysine principalement).

25

Une solution du peptide C13P30 de séquence YTLRAPRSPKMQVGSG-NH<sub>2</sub> (SEQ ID N° 16) ou de peptide CN32 de séquence YTLRAPRSPKMQGGS-NH<sub>2</sub> (SEQ ID N° 109) à 5mg/ml est préparée en tampon PBS Dulbecco NaCl 0,15M à pH 7,4. Un flacon de 20mg de KLH lyophilisée en tampon PBS (Pierce # 77600) est repris par 2ml d'eau PPI (eau pour préparation injectable),

de façon à obtenir une solution de KLH à 10mg/ml en tampon PBS.

1 ml de la solution de peptide (soit 5mg) est mélangée avec 1,25ml de la solution de KLH (soit 12,5mg). Sous hotte aspirante, 2,25ml d'une solution de glutaraldéhyde à 2% préparée extemporanément (à partir de glutaladéhyde à 25%, Sigma # G-5882) sont ajoutés au mélange. Afin d'éviter la formation de complexes de KLH, la solution de glutaraldéhyde à 2% est ajoutée goutte à goutte et sous agitation du mélange. La réaction de conjugaison se fait pendant 2 heures 30 d'incubation à température ambiante. La réaction de couplage est stoppée par ajout d'une solution de borohydrure de sodium à 100 mg/ml de façon à atteindre une concentration finale de 10mg/ml. Le mélange est mis à incuber une nuit à 4°C. Enfin la solution est dialysée sur une nuit à 4°C contre du tampon PBS Dulbecco à pH 7,4. La solution est enfin aliquotée et conservée à -80°C.

15

### **Exemple 3 : Immunisations avec des peptides**

Pour la production d'anticorps polyclonaux, des lapins (femelles de souche New Zealand) ont été immunisés à l'aide du peptide Cys-YTLRAPRSPKMVQGSG-NH<sub>2</sub> couplé à la KLH selon l'exemple 2. A la première injection, une émulsion de 1,5 ml de peptide couplé à la KLH avec 1,5 ml d'adjuvant de Freund complet (Sigma # F-5881) est réalisée, et 1ml de cette dernière émulsion (soit 200 µg de peptide) est injecté par voie intradermique à chacun des lapins. Deux rappels sont réalisés à 20 jours d'intervalle en injectant par voie intradermique 1ml d'une émulsion de peptide couplé à la KLH (soit 200µg de peptide) avec de l'adjuvant de Freund incomplet (Sigma # F-5506). Vingt jours après le second rappel, un troisième rappel est effectué de la même manière que les précédents rappels mais en injection sous-cutanée. Vingt jours après ce dernier rappel, et après évaluation du titre en anticorps obtenu, les lapins sont saignés. Plus particulièrement les anticorps polyclonaux des lapins identifiés par les numéros # 046 805 et 046 832 obtenus par immunisation avec le peptide C-YTLRAPRSPKMVQGS-NH<sub>2</sub> (SEQ ID N° 16) couplé à la KLH, et du lapin identifié # L01235, obtenus par immunisation avec le peptide C-YTLRAPRSPKMVQGS-NH<sub>2</sub> (SEQ ID N°109)

couplé à la KLH, ont été utilisés pour la suite des travaux.

#### Exemple 4 : obtention et purification des anticorps

Avant purification, les sérum de lapins sont centrifugés 30 minutes à 4 500 tours/minute à 4°C. Après décantation, le sérum est dilué de moitié dans du tampon glycine 1,5M, à pH 8,0 contenant du NaCl 1M.

#### Exemple 4.a : purification des IgG sur protéine A-sépharose

La purification des anticorps polyclonaux est réalisée par chromatographie d'affinité sur un gel de protéine A-sépharose (Amersham Biosciences #17.1279.02). La protéine A extraite de *Staphylococcus aureus* se combine spécifiquement au fragment Fc des molécules d'IgG. Ensuite les IgG, toutes sous classes confondues, sont éluées à pH 3,0.

Tous les tampons utilisés sont dégazés pendant 15 minutes dans un bain à ultrasons avant passage dans la colonne, afin de prévenir la formation de bulles.

Une colonne de chromatographie est préparée à l'aide de 12 ml de protéine A-sépharose. La colonne de gel est équilibrée pendant 40 minutes avec de l'eau distillée et dégazée, puis pendant 40 minutes avec du tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant du NaCl 0,5 M, et enfin avec du tampon glycine 1,5 M à pH 8,0 contenant du NaCl 1M, ceci jusqu'à obtention d'une ligne de base correcte.

Ensuite, 10ml de sérum de lapin dilué de moitié en tampon glycine 1,5 M à pH 8,0 contenant du NaCl 1 M, sont passés dans la colonne à un débit de 0,5ml/mn. Après apparition du pic d'albumine, les IgG du sérum sont éluées à l'aide d'une solution d'acide citrique 0,1M amenée à pH 3,0 avec du tampon tris sodium de citrate 0,1M. Le pic d'élation des IgG est récupéré et rapidement mis en dialyse en tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 une nuit à 4°C. La concentration des IgG est déterminée après dialyse par lecture de la densité optique à 280 nm contre du tampon PBS.

Après purification sur protéine A, la réactivité des anticorps polyclonaux est testée en ELISA sur des cupules revêtues soit de proBNP(1-108), soit de BNP(1-76), soit de BNP(77-108) adsorbé à 0,25 µg/ml. Les résultats obtenus

pour les anticorps polyclonaux du lapin # 046 805 sont présentés dans la figure 1. Les anticorps polyclonaux du lapin # 046 832 ont donné des résultats identiques. Les anticorps polyclonaux des lapins # 046 805 et # 046 832 sont relativement spécifiques du proBNP(1-108). Nous avons cependant pu noter la présence d'une faible réactivité anti-BNP(77-108) à des concentrations élevées, réactivité que nous avons pu supprimer en rendant les anticorps polyclonaux de ces lapins monospécifiques par épuisement sur résine BNP-K<sub>3</sub>-NHS-sépharose, selon le procédé décrit dans l'exemple 4.b.

10 **Exemple 4.b : Epuisement des IgG sur résine BNP-K<sub>3</sub>-NHS-sépharose**

Le but de cette opération est d'éliminer la réactivité croisée observée vis à vis du BNP(77-108).

La réactivité croisée de l'anticorps polyclonal obtenue étant localisée en position N-terminale de la molécule de BNP(77-108), il était important de bien présenter cette région du BNP(77-108) aux immunoglobulines à éliminer. A ces fins, le BNP(77-108) a été synthétisé avec une extension de 3 résidus de lysine en position C-terminale (BNP-K<sub>3</sub>) afin de favoriser son couplage à la résine NHS-sépharose par son extrémité C-terminale.

Le BNP-K<sub>3</sub> : S-P-K-M-V-Q-G-S-G-C-F-G-R-K-M-D-R-I-S-S-S-G-L-G-C-K-V-L-R-R-H-K-K-K (SEQ ID n° 104) a été synthétisé sur un synthétiseur Pioneer, en utilisant la chimie « Fmoc » (9-fluorénylméthoxy carbonyl) citée ci-dessus sous l'exemple 1.

5 mg de BNP-K<sub>3</sub> sont dissous à l'aide du tampon NaHCO<sub>3</sub> 100mM, à pH 8,3 additionné de NaCl 0,5M à une concentration de 10mg/ml. 2ml de résine NHS-sépharose (NHS-activated Sepharose 4 Fast Flow, Amersham Biosciences # 17.0906.01) sont centrifugés 30 secondes à 1000 tours/mn à 4°C. La résine est lavée avec 15ml d'une solution d'HCl 1mM froid. Après centrifugation et élimination de la solution d'HCl, la résine est mélangée au ligand BNP-K<sub>3</sub> à 10mg/ml. Le mélange est mis à incuber 1 heure à température ambiante sous agitation lente. Après centrifugation et élimination de la solution de ligand, les groupements non réactifs de la résine sont bloqués à l'aide de 5ml de tampon glycine 0,1M, à pH 8,0. Le mélange est mis à incuber 1 heure à température ambiante sous agitation lente. Après

centrifugation et élimination du tampon de blocage, la résine est reprise par 5 ml de tampon NaHCO<sub>3</sub> 100mM, à pH 8,3 additionné de NaCl 0,5M. Quatre lavages à l'aide de ce tampon sont réalisés. Au dernier lavage, le mélange est déposé sur une colonne de chromatographie.

5       Après préparation de la colonne de chromatographie, 10mg d'IgG du lapin # 046 805 ou du lapin # 046 832 sont déposés sur la colonne. Une pompe péristaltique reliée à la colonne permet de faire circuler les IgG du sérum de lapin toute une nuit à 4°C. Le lendemain, la solution d'IgG est récupérée (= filtrat). La fraction d'IgG liée sur le BNP-K<sub>3</sub> est éluee (= éluat) à l'aide du tampon Tris 20mM, à pH 8,0 contenant de l'urée 5M. On teste ensuite l'éluat et le filtrat afin de s'assurer de l'efficacité de l'épuisement. Les figures 2 et 3 montrent les résultats des tests réalisés en ELISA avec le filtrat des sérum polyclonaux des lapins # 046 805 et # 046 832, respectivement. Les figures 4 et 5 montrent les résultats des tests réalisés en ELISA avec l'éluat des sérum polyclonaux des lapins # 046 805 et # 046 832, respectivement.

10       Comme c'était attendu, le filtrat des sérum polyclonaux des lapins # 046 805 et # 046 832 est spécifique du proBNP(1-108) : aucune réactivité n'est observée sur le BNP(1-76) ni sur le BNP(77-108). L'éluat conserve une réactivité vis à vis du proBNP(1-108) importante, mais également une réactivité vis à vis du BNP(77-108). Ces résultats confirment l'efficacité de l'épuisement du sérum polyclonal du lapin sur la résine BNP-K<sub>3</sub>-NHS-sépharose.

15       Le BNP(77-108) provient de Sigma (# B-5900), tandis que le proBNP(1-108) et le BNP(1-76) ont été produits sous forme de protéines recombinées exprimées après clonage dans le vecteur pGEX-2T (Amersham Pharmacia Biotech) et transfection chez *E. coli*, par les techniques classiques bien connues de l'homme du métier. Le vecteur d'origine a été fourni par la société Berlex Biosciences (Richmond, CA, USA) et sa préparation est décrite par Yan et al. (PNAS, 2000, vol. 97, pp. 8525-8529). La concentration du proBNP(1-108) et celle du BNP(1-76) ont été déterminées par la méthode Bradford de dosage colorimétrique des protéines (Bradford M. Anal. Biochem. 1976; 72:248-54).

**Exemple 5 : Détermination du pourcentage de réaction croisée des anticorps anti proBNP(1-108) des lapins # 046 805 et # L01235 vis à vis du BNP(1-76) et du BNP(77-108)**

*Matériels :*

- 5 1) Phase solide : microplaqué Maxisorp à fond plat, Nunc (Danemark).
- 2) Le BNP(77-108) provient de Sigma (# B-5900), tandis que le proBNP(1-108) et le BNP(1-76) ont été produits sous forme de protéines recombinées. La concentration de ces solutions de protéines a été déterminée par la méthode Bradford de dosage colorimétrique des protéines (Bradford M. Anal. Biochem. 1976;72:248-54).
- 10 3) Le conjugué utilisé est un anticorps polyclonal anti-IgG de lapin couplé à la peroxidase (Sigma # A-9169)
- 4) Tampon de saturation : tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 1% d'albumine bovine sérique (BSA, Sigma #A-7888)
- 15 5) Tampon de dilution : tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 0,1% de BSA et 0,1% de Tween 20.
- 6) Solution de lavage : tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 0,1% de Tween 20.
- 20 7) Solution de révélation: la solution de révélation est composée :
  - 7a) d'un tampon substrat : Solution d'acide citrique 0,01M, et de citrate trisodique 0,04M contenant de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 0,33%, de pH final 5,6, et
  - 7b) d'un chromogène : comprimés d'OPD (orthophénylènediamine). 1 comprimé d'OPD à dissoudre dans 10ml de tampon substrat.
- 25 8) Solution d'arrêt : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N.

*Protocole :*

Le test consiste à évaluer l'immunoréactivité des anticorps polyclonaux directement sur les différentes protéines immobilisées dans les cupules d'une plaque de microtitrage.

✓ Plusieurs solutions de sensibilisation en tampon PBS Dulbecco pH 7,4 sont tout d'abord préparées : une première contenant du BNP(77-108) à 0,25µg/ml, une deuxième contenant du proBNP(1-108) à 0,25µg/ml, une

troisième contenant du BNP(1-76) à 0,25µg/ml, et une quatrième contenant de la GST (protéine témoin bruit de fond) à 0,25µg/ml.

✓ 100µl de chacune de ces solutions sont déposés séparément dans les puits d'une microplaqué.

5 ✓ La microplaqué est mise à incuber pendant une nuit à 4°C.

✓ Après élimination de la solution de sensibilisation, la microplaqué est lavée à l'aide de 300 µl d'un tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 0,1% de Tween 20, puis saturée par addition de 250µl du tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 1% de BSA.

10 ✓ La microplaqué est alors mise à incuber pendant 1 heure à 37°C.

✓ La microplaqué est ensuite lavée (3 fois) à l'aide de la solution de lavage.

15 ✓ Dans chaque cupule, 100µl de solution d'anticorps polyclonal, préalablement dilué à 2 et 1µg/ml pour le sérum polyclonal du lapin # 046 805 et au 1/2500 et 1/5000 pour le sérum polyclonal du lapin # L01235, sont déposés.

✓ Le milieu réactionnel est mis à incuber 2 heures à température ambiante

20 ✓ La microplaqué est ensuite lavée 3 fois avec 300µl de la solution de lavage.

✓ 100µl du conjugué anticorps polyclonal anti-IgG de lapin couplé à la peroxydase, dilué au 1/8000 en tampon de dilution, sont ajoutés dans chaque puits de la microplaqué.

25 ✓ Le milieu réactionnel est mis à incuber pendant 1 heure à température ambiante.

✓ Les plaques sont ensuite lavées (5 lavages) avec 300µl de la solution de lavage. Dans chaque cupule, 100 µl de la solution de révélation sont distribués. On laisse la réaction se développer à l'obscurité pendant 20 minutes à température ambiante (18-24°C).

30 ✓ Ensuite 50 µl de la solution d'arrêt sont distribués dans chaque cupule.

✓ Après arrêt de la réaction, la lecture de la densité optique est effectuée au spectrophotomètre à 490/620 nm.

**Tableau I : Résultats de la détermination du pourcentage de réaction croisée des anticorps polyclonaux des lapins #046 805, et #L01235 vis à vis du BNP(1-76) et du BNP(77-108)**

5

Pour un anticorps anti proBNP(1-108) donné, testé sur le BNP(77-108) adsorbé à 0,25µg/ml, sur le proBNP(1-108) adsorbé à 0,25µg/ml et sur la GST adsorbée à 0,25µg/ml, on calcule le pourcentage de la réaction croisée de l'anticorps avec le BNP(77-108) à l'aide de la formule suivante:

10

$$\% = \frac{DO_{(BNP77-108)} - DO_{(GST)}}{DO_{(proBNP1-108)} - DO_{(GST)}} \times 100$$

15

Pour un anticorps anti proBNP(1-108) donné, testé sur le BNP(1-76) adsorbé à 0,25µg/ml, sur le proBNP(1-108) adsorbé à 0,25µg/ml et sur la GST adsorbée à 0,25µg/ml, on calcule le pourcentage de la réaction croisée de l'anticorps avec le BNP(1-76) à l'aide de la formule suivante :

20

$$\% = \frac{DO_{(BNP1-76)} - DO_{(GST)}}{DO_{(proBNP1-108)} - DO_{(GST)}} \times 100$$

	% réaction croisée			
	sérum polyclonal #046 805 à 1µg/ml	sérum polyclonal #046 805 à 2 µg/ml	sérum polyclonal #L01235 1/5000	sérum polyclonal #L01235 1/2500
BNP(77-108) à 0,25µg/ml	1,44%	2,13%	3,55 %	4,3%
BNP(1-76) à 0,25µg/ml	1,00%	1,29%	0,21%	0,00%

25

Conclusion : La réaction croisée des anticorps polyclonaux de ces sérums est inférieure à 2% sur le BNP(1-76) et inférieure à 5% sur le BNP(77-108). La réactivité croisée vis à vis du BNP(77-108) peut être éliminée par le procédé

d'épuisement décrit dans l'exemple 4.b. Cependant, comme c'est décrit dans les exemples 19 et 20, dans les conditions d'un dosage immunoenzymométrique du proBNP(1-108), et aux concentrations de BNP(77-108) et de BNP(1-76) habituellement retrouvées chez les patients, ces anticorps polyclonaux peuvent être utilisés dans leur version non épuisée sans entraîner l'apparition de réaction croisée.

**10 Exemple 6 : identification de l'épitope reconnu par les sérum polyclonaux des lapins #046 805 et #046 832 avant et après épuisement sur résine BNP-K<sub>3</sub>-NHS-sépharose**

Les sérum polyclonaux des lapins # 046 805 et # 046 832 avant et après épuisement sur résine BNP-K<sub>3</sub>-NHS-sépharose ont été testés par la méthode spot afin d'identifier l'épitope reconnu par ces sérum polyclonaux. Cette méthode, décrite par Frank (Tetrahedron, 1992; 48:9217-32), permet la synthèse rapide sur membrane de nitrocellulose d'un grand nombre de peptides de séquences prédefinies. Les protocoles utilisés sont ceux décrits par Molina et al. (Pept. Res., 1996; 9:151-5). Sur une feuille de papier sont créées des zones circulaires (spots) d'environ 5 mm de diamètre, comportant une fonction aminée, qui servent de point d'ancrage à l'acide aminé C-terminal du peptide synthétique. L'allongement de la chaîne peptidique s'effectue par additions successives de Fmoc-acides aminés activés. Les chaînes latérales des acides aminés sont bloquées par des groupements chimiques adéquats. Tous les peptides sont synthétisés avec leur résidu N-terminal N-acétylé. A l'issue de la synthèse, les chaînes latérales sont déprotégées par action de l'acide trifluoroacétique. Ce traitement n'affecte pas la liaison entre le peptide et le support cellulosique, et la réactivité des peptides peut être évaluée par un essai colorimétrique.

La série de peptides synthétisés sur membrane est constituée de 32 pentadécapeptides décalés de 3 résidus d'acides aminés représentant la totalité de la séquence du proBNP(1-108).

**Tableau II : Membrane spot constituée de 32 pentadécapeptides décalés de 3 en 3 résidus d'acides aminés représentant la totalité de la séquence du proBNP(1-108).**

Séquence	N° spot	Séquence	N° spot
HPLGSPGSASDLETS (SEQ ID n° 23)	1	GVWKSREVATEGIRG (SEQ ID n° 39)	17
GSPGSASDLETSGLQ (SEQ ID n° 24)	2	KSREVATEGIRGHRK (SEQ ID n° 40)	18
GSASDLETSGLQEQR (SEQ ID n° 25)	3	EVATEGIRGHRKMV (SEQ ID n° 41)	19
SDLETSGLQEQRNHL (SEQ ID n° 26)	4	TEGIRGHRKMVLYTL (SEQ ID n° 42)	20
ETSGLQEQRNHLQGK (SEQ ID n° 27)	5	IRGHRKMOVLYTLRAP (SEQ ID n° 43)	21
GLQEQRNHLQGKLSE (SEQ ID n° 28)	6	HRKMOVLYTLRAPRSP (SEQ ID n° 44)	22
EQRNHLQGKLSELQV (SEQ ID n° 29)	7	MVLYTLRAPRSPK (SEQ ID n° 45)	23
NHLQGKLSELQVEQT (SEQ ID n° 30)	8	YTLRAPRSPK (SEQ ID n° 46)	24
QGKLSELQVEQTSLE (SEQ ID n° 31)	9	RAPRSPK (SEQ ID n° 47)	25
LSELQVEQTSLEPLQ (SEQ ID n° 32)	10	RSPK (SEQ ID n° 48)	26
LQVEQTSLEPLQESP (SEQ ID n° 33)	11	KMVQGSGCFGRK (SEQ ID n° 49)	27
EQTSLEPLQESPRPT (SEQ ID n° 34)	12	QGSGCFGRKMDRISS (SEQ ID n° 50)	28
SLEPLQESPRPTGVW (SEQ ID n° 35)	13	GCFGRKMDRISSSSG (SEQ ID n° 51)	29
PLQESPRPTGVWKS (SEQ ID n° 36)	14	GRKMDRISSSSGLGC (SEQ ID n° 52)	30
ESPRPTGVWKSREVA (SEQ ID n° 37)	15	MDRISSSSGLGCKVL (SEQ ID n° 53)	31
RPTGVWKSREVATEG (SEQ ID n° 38)	16	ISSSSGLGCKVLRRH (SEQ ID n° 54)	32

Après saturation de la membrane à l'aide de 30 ml du tampon TBS (Tris Buffer Saline) à pH 7,0 additionné de Tween 20 à 0,1%, de Blocking buffer à 5% (Euromedex # SU-07-250), et de saccharose à 5%, la réactivité de 20 ml du sérum polyclonal de lapin dilué à 10 $\mu$ g/ml est testée (sur une 5 incubation de 1 heure 30 minutes à 37°C sous agitation). Après lavage avec le tampon TBS à pH 7,0 additionné de Tween 20 à 0,1%, 20 ml de conjugué anti-IgG de lapin couplé à la phosphatase alcaline (Sigma # A-8025) sont mis à incuber 1 heure à température ambiante sous agitation. Enfin, après une dernière série de lavages avec 30 ml de solution de lavage, la révélation des 10 spots est réalisée par addition de 30 ml de solution de substrat (solution de 30ml de tampon CBS (Citrate Buffer Saline) à pH 7,0 contenant 120 $\mu$ l de BCIP (5-bromo-4-chloro-3-Indolyl phosphate) 0,15M, 150 $\mu$ l de MgCl<sub>2</sub> 1M et 180 $\mu$ l de MTT (Thiazolyl blue tetrazolium bromide) 0,1M. Après scanérisation de la membrane, l'intensité des spots de la membrane est évaluée (en unités 15 d'intensité relatives) à l'aide d'un logiciel de traitement d'image. Le bruit de fond est calculé à partir des spots non détectés par l'antisérum. Les résultats de l'analyse épitopique du sérum polyclonal du lapin # 046 805 avant épuisement sont présentés dans la figure 6. Cinq peptides (spots 22 à 26) sont détectés par le sérum polyclonal, et la séquence commune à ces cinq peptides est 20 R<sub>76</sub>S<sub>77</sub>P. Cependant, la réactivité est nettement augmentée lorsque le motif RAP se rajoute en position N-terminale du motif R<sub>76</sub>S<sub>77</sub>P. Les résultats de l'analyse épitopique du sérum polyclonal du lapin # 046 805 après épuisement sur résine BNP-K<sub>3</sub>-NHS-sépharose sont présentés dans la figure 7. Quatre peptides (spots 22 à 25) sont détectés par le sérum polyclonal, et la séquence commune à ces 4 peptides est RAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>P. Contrairement à ce qui est 25 observé pour le sérum polyclonal avant épuisement, aucune réactivité sur le motif R<sub>76</sub>S<sub>77</sub>P seul n'est observé (spot 26). Ceci explique qu'après épuisement sur résine BNP-K<sub>3</sub>-NHS-sépharose, le sérum polyclonal ne détecte plus le BNP(77-108) [pour rappel, le motif S<sub>77</sub>P correspond aux deux premiers acides 30 aminés de la séquence du BNP(77-108)]. En conclusion l'épitope reconnu par le sérum polyclonal du lapin # 046 805 rendu monospécifique est RAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>P.

Des résultats tout à fait identiques ont été obtenus à l'aide du sérum polyclonal du lapin # 046 832 : l'épitope reconnu par le sérum polyclonal de ce

lapin rendu monospécifique est également RAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>P.

**Exemple 7 : identification de l'épitope minimum des sérums polyclonaux des lapins # 046 805 et # 046 832 avant et après épuisement, par la méthode de l'Ala-scan**

Les sérums polyclonaux des lapins # 046 805 et # 046 832, avant et après épuisement sur résine BNP-K<sub>3</sub>-NHS-sépharose, ont été testés par la méthode spot (décrite dans l'exemple 6) afin d'identifier l'épitope minimum, dans le peptide charnière, permettant la reconnaissance spécifique du seul proBNP(1-108) par les sérums polyclonaux. On a synthétisé une membrane constituée de 16 pentadécapeptides reprenant la séquence du peptide charnière YTLLRAPRSPPKMVQGS et porteurs d'une substitution de proche en proche d'un acide aminé par un résidu alanine (Alanine-scanning ou « Ala-scan ») ou glycine, substitution à chaque fois décalée vers la droite d'un résidu d'acide aminé (tableau III). Les résultats de l'analyse Ala-scan des sérums polyclonaux des lapins # 046 805 et # 046 832 avant et après épuisement sur résine BNP-K<sub>3</sub>-NHS-sépharose sont présentés dans le tableau III.

**Tableau III : membrane spot à 16 pentadécapeptides YTLLRAPRSPPKMVQGS porteurs d'une substitution de proche en proche de chaque acide aminé par un résidu alanine ou glycine. Réactivité des sérums polyclonaux des lapins # 046 805 et # 046 832 avant et après épuisement sur résine BNP-K<sub>3</sub>-NHS-sépharose.**

25

SEQ ID	Séquence	N° spot	Réactivité (en unités d'intensité relatives) sérum polyclonal lapin # 046 805	Réactivité (en unités d'intensité relatives) sérum polyclonal lapin # 046 805 épuisé	Réactivité (en unités d'intensité relatives) sérum polyclonal lapin # 046 832 non épuisé	Réactivité (en unités d'intensité relatives) sérum polyclonal lapin # 046 832 épuisé

			non épuisé			
SEQ ID n° 46	YTLRAPRSPKMV QGS	716	84	69	151	132
SEQ ID n° 55	<u>ATLRAPRSPKMV</u> QGS	717	90	68	148	130
SEQ ID n° 56	<u>YALRAPRSPKMV</u> QGS	718	101	71	154	130
SEQ ID n° 57	<u>YTARAPRSPKMV</u> QGS	719	108	77	152	133
SEQ ID n° 58	YTLA <u>APRSPKMV</u> QGS	720	101	<u>39</u>	148	<u>106</u>
SEQ ID n° 59	YTLRG <u>PRSPKMV</u> QGS	721	93	<u>39</u>	156	132
SEQ ID n° 60	YTLRA <u>ARSPKMV</u> QGS	722	103	96	137	<u>48</u>
SEQ ID n° 61	YTLRAP <u>ASPKMV</u> QGS	723	<u>50</u>	<u>23</u>	150	<u>116</u>
SEQ ID n° 62	YTLRAP <u>RAPKMV</u> QGS	724	<u>58</u>	<u>44</u>	148	<u>113</u>
SEQ ID n° 63	YTLRAP <u>PRSAKMV</u> QGS	725	<u>74</u>	<u>41</u>	<u>85</u>	<u>67</u>
SEQ ID n° 64	YTLRAP <u>RSPAMV</u> QGS	726	138	118	157	148
SEQ ID n° 65	YTLRAP <u>PRSPKAV</u> QGS	727	98	77	150	130
SEQ ID n° 66	YTLRAP <u>PRSPKMA</u> QGS	728	100	68	138	130
SEQ ID n° 67	YTLRAP <u>PRSPKMV</u> AGS	729	95	71	142	133
SEQ ID n° 68	YTLRAP <u>PRSPKMV</u> QAS	730	107	78	143	134
SEQ ID n° 69	YTLRAP <u>PRSPKMV</u> QGA	731	112	68	153	132

NB : les résidus alanine ou glycine substitués aux acides aminés initiaux sont soulignés (A et G).

Les acides aminés critiques dans la reconnaissance de l'épitope reconnu par le sérum polyclonal du lapin # 046 805 avant épuisement sont R<sub>76</sub>S<sub>77</sub>P, tandis qu'après épuisement du sérum polyclonal du lapin # 046 805 sur résine BNP-K<sub>3</sub>-NHS-sépharose, outre le motif R<sub>76</sub>S<sub>77</sub>P, le motif RA devient contributeur. Pour le sérum polyclonal du lapin # 046 832 avant épuisement, seule la proline P<sub>78</sub> est contributrice, tandis qu'après épuisement du sérum polyclonal du lapin # 046 832 sur résine BNP-K<sub>3</sub>-NHS-sépharose, le motif contributeur est R-PR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>P. Ces résultats montrent donc que l'épitope minimum obligatoire dans la reconnaissance spécifique du proBNP(1-108) par les anticorps polyclonaux des lapins # 046 805 et #046 832 est RAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>P.

**Exemple 8 : identification de l'épitope minimum du sérum polyclonal du lapin #L01235, par la méthode de l'Ala-scan**

Le sérum polyclonal du lapin # L01235, spécifique d'emblée du proBNP(1-108) (épuisement inutile), a été testé par la méthode spot (décrite dans l'exemple 6) afin d'identifier l'épitope minimum, dans le peptide charnière, permettant la reconnaissance spécifique du seul proBNP(1-108) par le sérum polyclonal. La membrane utilisée est celle décrite dans l'exemple 7. Les résultats de l'analyse Ala-scan du sérum polyclonal du lapin # L01235 sont présentés dans le tableau IV.

**Tableau IV : membrane spot à 16 pentadécapeptides YTLRAPRSPKMQQGS porteurs d'une substitution de proche en proche de chaque acide aminé par un résidu alanine ou glycine. Réactivité du sérum polyclonal du lapin # L01235.**

SEQ ID	Séquence	Réactivité (en unités d'intensité relatives) sérum polyclonal du lapin # L01235
SEQ ID n° 46	YTLRAPRSPKMQQGS	94
SEQ ID n° 55	ATLRAPRSPKMQQGS	91
SEQ ID n° 56	YALRAPRSPKMQQGS	84
SEQ ID n° 57	YTARAPRSPKMQQGS	92

SEQ ID n° 58	YTLAAPRSPKMQGS	<u>66</u>
SEQ ID n° 59	YTLRGPRSPKMQGS	71
SEQ ID n° 60	YTLRA <u>ARSPKMQGS</u>	<u>67</u>
SEQ ID n° 61	YTLRAP <u>ASPKMQGS</u>	71
SEQ ID n° 62	YTLRAP <u>RAPKMQGS</u>	<u>47</u>
SEQ ID n° 63	YTLRAP <u>RSAKMQGS</u>	<u>53</u>
SEQ ID n° 64	YTLRAP <u>RSPAMQGS</u>	102
SEQ ID n° 65	YTLRAP <u>RSPKAVQGS</u>	73
SEQ ID n° 66	YTLRAP <u>RSPKMAQGS</u>	70
SEQ ID n° 67	YTLRAP <u>RSPKMQAGS</u>	70
SEQ ID n° 68	YTLRAP <u>RSPKMQQAS</u>	83
SEQ ID n° 69	YTLRAP <u>RSPKMQQGA</u>	80

NB : les résidus alanine ou glycine substitués aux acides aminés initiaux sont soulignés (A et G).

5 Comme pour les sérum polyclonaux des lapins # 046 805 et # 046 832 (exemple 7), ces résultats montrent que l'épitope minimum obligatoire dans la reconnaissance spécifique du proBNP(1-108) par les anticorps polyclonaux du lapin # L01235 est RAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>P.

## 10 Exemple 9 : Immunisation de souris avec la protéine recombinée proBNP(1-108)

On a immunisé des souris de souche BALB/c (femelles âgées de 6 semaines) à l'aide du proBNP(1-108) recombiné décrit dans l'exemple 4.b, par les techniques classiques bien connues de l'homme du métier. A la première injection, une émulsion de 1 ml de proBNP(1-108) avec 1ml d'adjuvant de Freund complet (Sigma # F-5881) est réalisée, et 300µl de cette émulsion (soit 100µg de protéine) sont injectés par voie sous-cutanée à chacune des souris. Deux rappels sont réalisés à 15 jours d'intervalle par injection par voie intrapéritonéale de 300µl d'une émulsion de proBNP(1-108) (soit 100µg de protéine) avec de l'adjuvant de Freund incomplet (Sigma # F-5506). Quinze jours après le second rappel, un troisième rappel est effectué de la même manière que les précédents rappels mais en injection

sous-cutanée. Enfin, 15 jours après ce dernier rappel, on réalise des prélèvements sanguins sur les souris pour analyser la réponse immunitaire par la technique spot. La réponse immunitaire de la souris 12 s'est avérée particulièrement intéressante pour la suite des travaux.

5

**Exemple 10 : Identification des épitopes reconnus par les anticorps polyclonaux de la souris 12 sur la séquence du proBNP(1-108)**

La méthode spot utilisée pour identifier les épitopes reconnus par les anticorps polyclonaux de la souris 12 sur la séquence du proBNP(1-108) est décrite dans l'exemple 6.

La série de peptides synthétisés sur membrane est constituée de 94 pentadécapeptides, décalés chacun d'un résidu d'acide aminé, représentant la totalité de la séquence du proBNP(1-108). La réactivité du sérum polyclonal de la souris 12 dilué au 1/500ème est testée sur cette membrane comme c'est décrit dans l'exemple 6. Après scanérisation de la membrane, l'intensité des spots de la membrane est évaluée (en unités d'intensité relatives) à l'aide d'un logiciel de traitement d'image. Le bruit de fond, calculé à partir des spots non détectés par l'antisérum, était de 30 unités d'intensité relatives.

Trois régions situées en position N-terminale de la séquence du proBNP(1-108) sont ainsi particulièrement bien détectées par les anticorps de l'antisérum de la souris 12 : séquence H<sub>1</sub>PLGSPGSASDLETS<sub>15</sub> (SEQ ID N° 23) (spots 1 à 12), séquence L<sub>17</sub>QEQRNHLQGK<sub>27</sub> (SEQ ID N° 123) (spots 17 à 27) et séquence L<sub>38</sub>EPLQESPRPTG<sub>49</sub> (SEQ ID N° 124) (spots 38 à 49).

De façon surprenante, l'antisérum de la souris 12 contient également des anticorps capables de reconnaître des spots dont la séquence peptidique comprend le motif RAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>P : spots 64 à 68. Les séquences peptidiques des spots sont décrites dans le tableau V.

30

**Tableau V : Epitopes de la région charnière reconnus, à l'aide de la technique spot, par l'antisérum de la souris 12.**

N° spot	séquence peptidique du spot détecté	réactivité en unités relatives d'intensité	N° spot	séquence peptidique du spot détecté	réactivité en unités relatives d'intensité
1	HPLGSPGSASDLETS (SEQ ID n° 23)	177,0	38	LEPLQESPRPTGVWK (SEQ ID n° 88)	177,0
2	PLGSPGSASDLETSG (SEQ ID n° 70)	170,0	39	EPLQESPRPTGVWKS (SEQ ID n° 89)	188,0
3	LGSPGSASDLETSGL (SEQ ID n° 71)	145,7	40	PLQESPRPTGVWKSRSR (SEQ ID n° 90)	109,0
4	GSPGSASDLETSGLQ (SEQ ID n° 24)	166,3	41	LQESPRPTGVWKSRE (SEQ ID n° 91)	166,0
5	SPGSASDLETSGLQE (SEQ ID n° 72)	185,0	42	QESPRPTGVWKSREVA (SEQ ID n° 92)	164,0
6	PGSASDLETSGLQEQQ (SEQ ID n° 73)	169,3	43	ESPRPTGVWKSREVA (SEQ ID n° 93)	147,0
7	GSASDLETSGLQEQR (SEQ ID n° 25)	155,2	44	ESPRPTGVWKSREVA (SEQ ID n° 93)	149,0
8	SASDLETSGLQEQRN (SEQ ID n° 74)	176,5	45	SPRPTGVWKSREVAT (SEQ ID n° 94)	175,0
9	ASDLETSGLQEQRNH (SEQ ID n° 75)	108,0	46	PRPTGVWKSREVATE (SEQ ID n° 95)	186,0
10	SDLETSGLQEQRNHLL (SEQ ID n° 76)	118,3	47	RPTGVWKSREVATEG (SEQ ID n° 16)	171,0
11	DLETSGLQEQRNHLLQ (SEQ ID n° 77)	121,0	48	PTGVWKSREVATEGI (SEQ ID n° 96)	148,0
12	LETSGLQEQRNHLLQG (SEQ ID n° 78)	101,0	49	TGVWKSREVATEGIR (SEQ ID n° 97)	72,0
17	LQEQRNHLLQGKLSEL (SEQ ID n° 79)	99,0	61	IRGHRKVMVLYTLRAP (SEQ ID n° 98)	105,8
18	QEQRNHLLQGKLSELQ (SEQ ID n° 80)	179,8	62	RGHRKVMVLYTLRAPR (SEQ ID n° 99)	97,7
19	EQRNHLQGKLSELQV (SEQ ID n° 29)	189,6	63	GHRKVMVLYTLRAPRS (SEQ ID n° 100)	95,9
20	QRNHLLQGKLSELQVE (SEQ ID n° 81)	211,8	64	HRKVMVLYTLRAPRSP (SEQ ID n° 53)	92,8
21	RNHLQGKLSELQVEQ	219,0	65	RKVMVLYTLRAPRSPK (SEQ	48,0

	(SEQ ID n° 82)			ID n° 101)	
22	NHLQGKLSELQVEQT (SEQ ID n° 30)	213,3	66	KMVLYTLRAPRSPKM (SEQ ID n° 102)	48,0
23	HLQGKLSELQVEQTS (SEQ ID n° 83)	202,6	67	MVLVTLRAPRSPKMV (SEQ ID n° 45)	42,1
24	LQGKLSELQVEQTSLS (SEQ ID n° 84)	189,5	68	VLYTLRAPRSPKMVQ (SEQ ID n° 103)	38,4
25	QGKLSELQVEQTSLE (SEQ ID n° 85)	187,3			
26	GKLSELQVEQTSLEP (SEQ ID n° 86)	36,6			
27	KLSELQVEQTSLEPL (SEQ ID n° 87)	69,9			

**Exemple 11 : Obtention d'anticorps monoclonaux reconnaissant de façon spécifique le proBNP(1-108), à l'exclusion substantielle du BNP(1-76) et du BNP(77-108)**

5 La souris (femelle BALB/c de 5 semaines) sélectionnée pour la production d'anticorps monoclonaux a été immunisée avec le peptide SEQ ID N° 16 C-YTLRAPRSPKMVQGSG-NH2 (C13P30) couplé à la KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) selon le protocole suivant : 100µg du peptide couplé à la KLH dilué volume à volume avec de l'adjuvant complet de Freund ont été 10 injectés par voie sous-cutanée. Quatre rappels ont été effectués à un intervalle de 3 semaines avec 100µg du peptide couplé à la KLH dilué volume à volume avec de l'adjuvant incomplet de Freund, injectés par voie sous-cutanée.

15 Trois jours avant la réalisation de la fusion lymphocytaire, la souris a subi une hyper-immunisation selon le protocole suivant : la dose totale d'immunogène, ici 100µg de peptide C-YTLRAPRSPKMVQGSG-NH2 couplé à la KLH en tampon PBS stérile, est fractionnée en 4 injections. La première et la seconde injections correspondent chacune à 1/10ème de la dose totale. Ces 20 injections sont réalisées par voie sous-cutanée en différents endroits et à 45 minutes d'intervalle. La troisième injection, qui correspond aux 2/10èmes de la dose totale, est réalisée 45 minutes après la seconde injection, par voie sous-cutanée. Trente minutes après la troisième injection, une injection par voie

intrapéritonéale de 100µl d'une solution de prométhazine à 1mg/ml en PBS stérile (Phénergan à 2,5%, Laboratoires Medeva Parma) est réalisée afin de prévenir tout choc anaphylactique. Enfin 15 minutes après, la dernière injection correspondant aux 6/10èmes de la dose totale est effectuée par voie 5 intrapéritonéale.

L'hybridation lymphocytaire est réalisée selon la méthode décrite par Koehler et Milstein (Nature, 1975; 256:495-97). Elle est réalisée à partir des cellules lymphocytaires extraites de la rate de la souris et des cellules myélomateuses (P3-X63-Ag8.653) préalablement mises en culture en milieu 10 RPMI 1640 (Bio-Whittaker # BE12-167F), complémenté avec un mélange de L-glutamine, pénicilline et streptomycine (Sigma # G-6784), additionné de 10% de sérum de veau fœtal préalablement décomplémenté (Bio-Whittaker #BE02701E) et de 8-azaguanine (Sigma # A-8526). Les cellules lymphocytaires et les cellules myélomateuses, préalablement placées en milieu 15 RPMI 1640 (Bio-Whittaker # BE12-167F) complémenté avec un mélange de L-glutamine, pénicilline et streptomycine (Sigma # G-6784) sans addition de sérum de veau fœtal, sont mélangées à raison de 5 cellules lymphocytaires pour 1 cellule myélomateuse. Après centrifugation du mélange 7 minutes à 900 tr/mn à température ambiante, et remise en suspension du 20 culot cellulaire, 1ml de polyéthylène glycol Hybril-Max® (Sigma # P-7777) est ajouté. Après 1 minute d'incubation au bain marie à 37°C, les cellules sont centrifugées pendant 1 minute et trente secondes à 1000 tr/mn à température ambiante. Enfin après incubation de 2 minutes au bain marie à 37°C, le culot 25 est remis en suspension et 6 ml de milieu RPMI 1640 (Bio-Whittaker # BE12-167F) complémenté avec un mélange de L-glutamine, pénicilline et streptomycine (Sigma # G-6784) préalablement placé à 37°C, sont ajoutés à raison de 100µl toutes les 5 secondes, et 9ml de ce même milieu sont ajoutés en une fois. Après centrifugation pendant 10 minutes à 900 tr/mn à TA, et élimination du surnageant, le culot est repris par du milieu RPMI 1640 (Bio- 30 Whittaker # BE12-167F), complémenté avec un mélange de L-glutamine, pénicilline et streptomycine (Sigma # G-6784), additionné de 15% de sérum de veau fœtal préalablement décomplémenté (Bio-Whittaker # BE02701E) et de HAT (Hypoxanthine, aminoptérine, thymidine Sigma # H-0262), de façon à

distribuer, sous 100µl, 120 000 cellules par puits. La solution est déposée sous 100µl dans les puits des plaques de culture à 96 puits préalablement 5ensemencés de macrophages murins. Les plaques sont ensuite placées dans un incubateur à CO<sub>2</sub>. Quinze jours après l'hybridation lymphocytaire, le nombre de clones présents dans les plaques de fusion est estimé et exprimé en pourcentage de développement des hybridomes.

La sélection des hybridomes est effectuée en ELISA sur proBNP(1-108), BNP(1-76), BNP(77-108) et un peptide porteur de la séquence RAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>P (C13P30). Seuls les hybridomes sécrétant des anticorps 10capables de détecter le proBNP(1-108) et le peptide C13P30 porteur de la séquence RAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>P et ne reconnaissant substantiellement pas le BNP(1-76) ni le BNP(77-108), sont retenus. Les hybridomes sélectionnés sont 15maintenus en culture et clonés en dilution limite. Les hybridomes ainsi clonés peuvent ensuite être utilisés pour la production de l'anticorps monoclonal en liquide d'ascite.

C'est ainsi que les inventeurs ont produit un hybridome murin, le clone 3D4, sécrétant une immunoglobuline d'isotype IgG<sub>1κ</sub> présentant les caractéristiques des anticorps selon l'invention. Cet hybridome a été déposé le 31 juillet 2003 à la CNCM (Collection Nationale de Cultures de 20Microorganismes, Institut Pasteur, 25, rue du Docteur Roux, 75 724 Paris, Cedex 15, France) sous le numéro d'enregistrement CNCM I-3073.

L'invention a donc encore pour objets l'hybridome 3D4 déposé à la CNCM sous le numéro d'enregistrement CNCM I-3073 et l'anticorps monoclonal qu'il sécrète.

25

#### **Exemple 12 : Validation en ELISA de la spécificité de l'anticorps produit par l'hybridome 3D4**

*Matériels :*

- 1) Phase solide : microplaqué Maxisorp à fond plat, Nunc 30(Danemark).
- 2) Le BNP(77-108) provient de Sigma (# B-5900), tandis que le proBNP(1-108) et le BNP(1-76) ont été produits sous forme de protéines recombinées. La concentration de ces solutions de protéines a été déterminée

par la méthode Bradford de dosage colorimétrique des protéines (Bradford M. Anal. Biochem. 1976;72:248-54).

3) Le conjugué utilisé est un anticorps polyclonal d'âne anti-IgG de souris couplé à la peroxydase (Jackson Immunoresearch # 715-035-150)

5 4) Tampon de saturation : tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 1% d'albumine bovine sérique (BSA, Sigma # A-7888)

5 5) Tampon de dilution : tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 0,1% de BSA et 0,1% de Tween 20.

10 6) Solution de lavage : tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 0,1% de Tween 20.

7) Solution de révélation: la solution de révélation est composée :

7a) d'un tampon substrat : Solution d'acide citrique 0,01M, et de citrate trisodique 0,04M contenant de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 0,33%, de pH final 5,6, et

15 7b) d'un chromogène : comprimés d'OPD (orthophénylènediamine). 1 comprimé d'OPD à dissoudre dans 10ml de tampon substrat.

8) Solution d'arrêt : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N.

#### Protocole :

20 Le test consiste à évaluer l'immunoréactivité du surnageant de culture de l'hybridome 3D4 directement sur les différentes protéines immobilisées dans les cupules d'une plaque de microtitration.

25 ✓ Plusieurs solutions de sensibilisation en tampon PBS Dulbecco pH 7,4 sont tout d'abord préparées : une première contenant du BNP(77-108) à 1µg/ml, une deuxième contenant du proBNP(1-108) à 1µg/ml, et une troisième contenant du BNP(1-76) à 1µg/ml.

✓ 100µl de chacune de ces solutions sont déposés séparément dans les puits d'une microplaqué.

✓ La microplaqué est mise à incuber pendant une nuit à 4°C.

30 ✓ Après élimination de la solution de sensibilisation, la microplaqué est lavée à l'aide d'un tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 0,1% de Tween 20, puis saturée par addition de 250µl du tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 1% de BSA.

- ✓ La microplaque est alors mise à incuber pendant 1 heure à 37°C.
- ✓ La microplaque est ensuite lavée (3 fois) avec 300 µl de la solution de lavage.
- ✓ Dans chaque cupule, 100µl de surnageant de l'hybridome 3D4, préalablement dilué au 1/2 dans le tampon de dilution, sont déposés.
- ✓ Le milieu réactionnel est mis à incuber 2 heures à température ambiante
- ✓ La microplaque est ensuite lavée 3 fois avec 300µl de la solution de lavage.
- ✓ 100 µl de conjugué, anticorps polyclonal anti-IgG de souris couplé à la peroxydase dilué au 1/2000 en tampon de dilution, sont ajoutés à chaque puits de la microplaque.
- ✓ Le milieu réactionnel mis à incuber pendant 1 heure à température ambiante.
- ✓ 15 Les plaques sont ensuite lavées (5 lavages) avec 300µl de la solution de lavage. Dans chaque cupule, 100 µl de la solution de révélation sont distribués. On laisse la réaction se développer à l'obscurité pendant 20 minutes à température ambiante (18-24°C).
- ✓ Ensuite 50 µl de la solution d'arrêt sont distribués dans chaque cupule.
- ✓ 20 Après arrêt de la réaction, la lecture de la densité optique est effectuée au spectrophotomètre à 490/620 nm.

La figure 8 illustre le résultat de ce test : l'anticorps produit dans le surnageant de l'hybridome 3D4 est capable de détecter uniquement le proBNP(1-108) et le peptide d'immunisation C13P30, aucune réactivité n'est obtenue sur le BNP(1-76) et le BNP(77-108). Ces résultats valident la spécificité de l'anticorps produit par l'hybridome 3D4 pour le proBNP(1-108) à l'exclusion du BNP(1-76) et du BNP(77-108).

30 L'anticorps selon l'invention issu de l'hybridome 3D4 est donc bien un anticorps reconnaissant de façon spécifique le proBNP(1-108), à l'exclusion substantielle du BNP(1-76) et du BNP(77-108).

**Exemple 13 : Validation en western-blot de la spécificité de l'anticorps produit par l'hybridome 3D4**

*Matériels :*

- 5 1) Appareillage d'électrophorèse SDS-PAGE classique
- 2) Gel de concentration : acrylamide à 5%
- 3) Gel de séparation : acrylamide à 16%
- 4) Tampon anode : Tris 0,2M, pH 8,9
- 5) Tampon cathode : Tris-tricine 0,1M ; SDS à 0,1%
- 10 6) Tampon de l'échantillon : Tris 0,5M, pH 6,8 ; glycérol à 25% ; SDS à 2% ; bêta-mercaptopropanoïde 14,4mM ; bleu de bromophénol à 0,1%
- 7) Appareil de transfert électrophorétique
- 8) Tampon de transfert : Tris base 25 mM ; glycine 190 mM ; méthanol à 20% ; SDS à 0,05%
- 15 9) Le BNP(77-108) provient de Sigma (# B-5900), tandis que le proBNP(1-108)-GST, le BNP(1-76)-GST et la GST (utilisée comme témoin négatif) ont été produits sous forme de protéines recombinées. La concentration de ces solutions de protéines a été déterminée par la méthode Bradford de dosage colorimétrique des protéines (Bradford M. Anal. Biochem. 1976;72:248-54).
- 20 10) Le conjugué utilisé est un anticorps polyclonal d'âne anti-IgG de souris couplé à la peroxydase (Jackson Immunoresearch # 715-035-150)
- 11) Trousse ECL de détection en western-blot (Amersham Biosciences # RPN2106)

25 *Protocole :*

La mise œuvre de ce test comprend trois grandes étapes : la migration électrophorétique des différentes protéines dans un gel d'acrylamide à 16%, ensuite le transfert de ces protéines sur une membrane de nitrocellulose, et enfin le western-blot.

30

✓ Diverses solutions sont préparées en tampon d'échantillon sous un volume final de 35 µl : une première comprenant 1µg de proBNP(1-108)-GST, une deuxième comprenant 1µg de GST, une troisième comprenant 1µg de

BNP(1-76)-GST, et une quatrième comprenant 1µg de BNP(77-108).

✓ Chaque solution est mise à incuber au bain-marie pendant 5 minutes à 100°C, puis déposée dans un puits du gel. La migration au travers le gel d'acrylamide est réalisée sous voltage constant à 120 V pendant 1heure 30. La figure 9 correspond à une photographie du gel d'acrylamide obtenu. Les protéines déposées sont colorées par le bleu de coomassie.

✓ Après migration, les protéines du gel sont mises à transférer sur une membrane de nitrocellulose durant 1 heure sous 120 mA.

✓ La membrane de nitrocellulose est ensuite lavée avec du tampon PBS + Tween à 0,1%, et mise à saturer pendant 30 minutes à température ambiante en tampon PBS + Tween à 0,1% + lait écrémé à 2%

✓ Après 3 lavages avec du tampon PBS + Tween 0,1%, la membrane est mise à incuber pendant 1 heure à +37°C, sous agitation, avec 5 ml de surnageant de l'hybridome 3D4.

15 ✓ Après 3 lavages avec le tampon PBS + Tween à 0,1%, la membrane est mise à incuber pendant 1 heure à température ambiante sous agitation avec 10 ml de conjugué anti-IgG de souris couplé à la peroxydase dilué au 1/2000 en tampon PBS + Tween 0,1% + lait écrémé à 2%

20 ✓ Après 3 lavages avec le tampon PBS + Tween 0,1%, la membrane est trempée dans le réactif de révélation ECL, avant d'être exposée à un film photographique pendant 4 minutes.

25 Comme le montre la figure 10 qui correspond à l'image scannée de la photographie obtenue, l'anticorps produit dans le surnageant de l'hybridome 3D4 est capable de détecter uniquement la bande correspondant au proBNP(1-108). Le BNP(1-76), le BNP(77-108), ainsi que la GST ne sont pas détectées par l'anticorps de l'hybridome 3D4. Ces résultats valident également la spécificité l'anticorps produit par l'hybridome 3D4 pour le proBNP(1-108).

30 L'anticorps selon l'invention issu de l'hybridome 3D4 est donc bien un anticorps reconnaissant de façon spécifique le proBNP(1-108), à l'exclusion substantielle du BNP(1-76) et du BNP(77-108).

**Exemple 14 : Identification de l'épitope reconnu par l'anticorps produit par l'hybridome 3D4 par la méthode spot**

Le surnageant de l'hybridome 3D4 a été testé par la méthode spot (décrite dans l'exemple 6) afin d'identifier l'épitope reconnu par l'anticorps de l'hybridome 3D4. Les résultats obtenus indiquent que l'anticorps 3D4 reconnaît effectivement des séquences peptidiques comprenant le motif RAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>P.

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus en ELISA (exemple 12) et western-blot (exemple 13) validant la spécificité de l'anticorps 3D4 pour le proBNP(1-108).

10

**Exemple 15 : dosage radioimmunométrique du proBNP(1-108)**

*Matériels :*

- 1) Phase solide : microplaquette Maxisorp à fond plat et puits sécables, Nunc (Danemark).
- 15 2) L'anticorps de capture utilisé est l'anticorps polyclonal obtenu à partir du sérum du lapin # 046 805 non épuisé.
- 3) Le conjugué utilisé est un anticorps anti-BNP(77-108) marqué à l'I<sup>125</sup> (anti-BNP-I<sup>125</sup>). Il s'agit de l'anticorps traceur du kit BNP Shionoria commercialisé par la société Shionogi.
- 20 4) Tampon de saturation : tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 1% d'albumine bovine sérique (BSA, Sigma # A-7888)
- 5) Tampon de dilution : tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 0,1% de BSA et 0,1% de tween 20 (Sigma, # P-1379).
- 25 4) Tampon de lavage : tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 0,1% de Tween 20.
- 5) Etalon proBNP(1-108) : produit sous forme de protéine recombinée.

30

*Protocole :*

Le principe du test utilisé est basé sur la méthode radioimmunologique de type sandwich, réalisé en microplaquette à fond plat et à cupules sécables. Il

s'agit d'un test en un temps où échantillon (ou solution étalon de proBNP(1-108)) et traceur sont ajoutés l'un après l'autre sans lavage intermédiaire.

- ✓ Une solution de sensibilisation est tout d'abord préparée avec 5 l'anticorps polyclonal du lapin # 046 805 dilué en tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 à 40µg/ml. 300µl de cette solution sont déposés dans chacun des puits de la microplaqué.
- ✓ La microplaqué est mise à incuber pendant une nuit à 4°C.
- ✓ Après élimination de la solution de sensibilisation, la microplaqué est 10 lavée à l'aide de 300 µl d'un tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 0,1% de Tween 20, puis saturée par addition de 300µl du tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 1% de BSA.
- ✓ La microplaqué est alors mise à incuber pendant 1heure à 37°C.
- ✓ La microplaqué est ensuite lavée (3 fois) à l'aide de 300 µl de la 15 solution de lavage (tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 additionné de Tween 20 à 0,1%).
- ✓ Dans chaque cupule, 100µl de solution étalon de proBNP(1-108), de sérum ou de plasma sont déposés. Le proBNP(1-108), s'il est présent, se lie à l'anticorps de capture retenu sur la phase solide.
- ✓ 200µl de la solution de traceur anti-BNP- $I^{125}$  prête à l'emploi (extraite du kit BNP Shionoria de Shionogi) sont ajoutés dans chacun des puits.
- ✓ Le milieu réactionnel est mis à incuber pendant une nuit (18-22h) à 4°C.
- ✓ Le lendemain, la microplaqué est lavée (3 fois) à l'aide de 300µl de 25 la solution de lavage. Au dernier lavage et après aspiration de la solution de lavage, chaque cupule est transférée dans un tube préalablement identifié.
- ✓ La radioactivité présente dans chaque cupule et proportionnelle à la quantité de traceur fixée, donc à la quantité de proBNP(1-108) présente dans l'échantillon, est mesurée à l'aide d'un compteur gamma.

0 La figure 11 présente les résultats obtenus à l'aide d'une gamme étalon de proBNP(1-108).

**Exemple 16 : résultats du dosage d'échantillons humains**

A l'aide du dosage IRMA proBNP(1-108) selon l'invention décrit dans l'exemple 15 et du dosage BNP(1-76) commercialisé par la société Roche et réalisé sur l'automate Elecsys®, 14 prélèvements de sujets sains et 15 prélèvements de patients souffrant d'insuffisance cardiaque ont été testés. Les échantillons sanguins ont tous été prélevés sur tube contenant de l'EDTA. La figure 12 présente les résultats en cpm (coups par minute) des tests de ces échantillons avec le dosage IRMA proBNP(1-108) selon l'invention. Les résultats obtenus sur les prélèvements de patients souffrant d'insuffisance cardiaque sont significativement plus élevés que ceux obtenus sur les prélèvements de sujets sains. Ces résultats mettent en évidence la présence de proBNP(1-108) circulant dans les prélèvements de patients souffrant d'insuffisance cardiaque et constituent la première démonstration que le proBNP(1-108) sérique est un marqueur prédictif de l'insuffisance cardiaque. La figure 13 présente la corrélation entre les concentrations de proBNP(1-108) (en pg/ml) déterminées à l'aide du dosage IRMA proBNP selon l'invention et les concentrations de BNP(1-76) (pg/ml) déterminées à l'aide du dosage Roche sur l'automate Elecsys®, des prélèvements de 14 patients souffrant d'insuffisance cardiaque. La corrélation observée est significative avec un coefficient  $R^2 = 0,85$ .

**Exemple 17 : couplage de l'anticorps polyclonal du lapin #046 805 à la biotine**

La méthode de couplage utilise un dérivé N-Hydroxy Succinimide (NHS) de la biotine qui réagit avec les amines primaires des IgG pour former une liaison amide.

Une solution de (+)-Biotine N-succinimidyl ester (Fluka # 14405) à 100mM est préparée par dissolution de la Biotine dans de la diméthylformamide. La biotinylation est réalisée dans un flacon en verre. 500 µg de l'anticorps polyclonal du lapin # 046 805 préalablement purifié mais non épuisé sont déposés dans le flacon avec 17µl de la solution de biotine 100mM (le rapport molaire biotine/anticorps est de 500). La réaction se fait en tampon PBS Dulbecco à pH 7,4. Le mélange réactionnel est mis à incuber pendant 1

heure 30 à température ambiante sous agitation lente. Après couplage, la biotine est inactivée par ajout d'un volume de tampon glycine 2M. Le mélange est mis incuber pendant 10 minutes à température ambiante sous agitation lente. Enfin le mélange est mis à dialyser une nuit à 4°C contre du tampon PBS Dulbecco à pH 7,4. Le lendemain, une solution d'azoture de sodium est ajoutée à 0,02% en concentration finale. Le conjugué est conservé à 4°C.

#### **Exemple 18 : Dosage immunoenzymométrique du proBNP(1-108)**

Un dosage immunoenzymométrique selon l'invention a également été  
10 mis au point.

##### *Matériels :*

- 1) Phase solide : microplaquette Maxisorp à fond plat, Nunc (Danemark).
- 2) L'anticorps de capture utilisé est un anticorps polyclonal anti-BNP(77-108) commercialisé par la société Strategic Biosolution (# B9105RA00-A0).
- 15 3) Le conjugué utilisé est l'anticorps polyclonal du lapin # 046 805 non épuisé couplé à la biotine selon le procédé décrit dans l'exemple 17.
- 4) Conjugué streptavidine-peroxydase (Amersham Pharmacia Biotech # RPN1231V)
- 20 5) Tampon de saturation : tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 1% d'albumine bovine sérique (BSA, Sigma # A-7888)
- 6) Tampon de dilution : tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 0,1% de BSA et 0,1% de Tween 20.
- 25 7) Solution de lavage : tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 0,1% de Tween 20.
- 8) Etalon proBNP(1-108) : protéine recombinée.
- 9) Solution de révélation: la solution de révélation est composée :
  - 9a) d'un tampon substrat : Solution d'acide citrique 0,01M, et de citrate trisodique 0,04M contenant de l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 0,33%, de pH final 5,6, et
  - 30 9b) d'un chromogène : comprimés d'OPD (orthophénylénediamine). 1 comprimé d'OPD à dissoudre dans 10ml de tampon substrat.
- 10) Solution d'arrêt : H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N.

*Protocole :*

Le principe du test utilisé est basé sur la méthode enzyomoimmunologique de type sandwich, réalisé en microplaqué à fond plat. Il s'agit d'un test en deux temps où l'échantillon (ou la solution étalon) est tout d'abord mis à incuber avec l'anticorps de capture, puis après incubation et lavages, l'anticorps de détection est ajouté.

- ✓ Une solution de sensibilisation est tout d'abord préparée avec l'anticorps polyclonal anti-BNP(77-108) dilué en tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 à 10µg/ml. 100µl de cette solution sont déposés dans chacun des puits de la microplaqué.
- ✓ La microplaqué est mise à incuber pendant une nuit à 4°C.
- ✓ Après élimination de la solution de sensibilisation, la microplaqué est lavée à l'aide de 300 µl d'un tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 0,1% de Tween 20, puis saturée par addition de 250µl du tampon PBS Dulbecco à pH 7,4 contenant 1% de BSA.
- ✓ La microplaqué est alors mise à incuber pendant 1 heure à 37°C.
- ✓ La microplaqué est ensuite lavée (3 fois) à l'aide de la solution de lavage.
- ✓ Dans chaque cupule, 100µl de solution étalon de proBNP(1-108), de sérum ou de plasma sont déposés. Le proBNP(1-108), s'il est présent, se lie à l'anticorps de capture retenu sur la phase solide.
- ✓ Le milieu réactionnel est mis à incuber 2 heures à température ambiante
- ✓ La microplaqué est ensuite lavée (5 lavages) avec 300µl de la solution de lavage.
- ✓ 100 µl d'anticorps polyclonal du lapin # 046 805 biotinylé (concentré à 6µg/ml), sont ajoutés dans chaque puits de la microplaqué.
- ✓ Le milieu réactionnel mis à incuber pendant 2 heures à température ambiante.
- ✓ La microplaqué est ensuite lavée (5 lavages) avec 300µl de la solution de lavage.

- ✓ Enfin 100µl de conjugué streptavidine-POD dilué au 1/1000ème sont ajoutés dans chacun des puits de la microplaqué.
- ✓ Le milieu réactionnel est mis à incuber pendant 1 heure 30 à température ambiante.
- 5 ✓ Les plaques sont ensuite lavées (5 lavages) avec 300µl de la solution de lavage. Dans chaque cupule, 100 µl de la solution de révélation sont distribués. On laisse la réaction se développer à l'obscurité pendant 20 minutes à température ambiante (18-24°C).
- 10 ✓ Ensuite 50 µl de la solution d'arrêt sont distribués dans chaque cupule.
- ✓ Après arrêt de la réaction, la lecture de la densité optique est effectuée au spectrophotomètre à 490/620 nm.

15 La figure 14 présente les résultats obtenus à l'aide d'une gamme étalon de proBNP(1-108).

20 **Exemple 19: Evaluation de la réaction croisée, vis à vis du BNP(1-76) et du BNP(77-108), de l'anticorps polyclonal du lapin # 046 805 non épuisé couplé à la biotine, utilisé en sandwich dans le dosage ELISA proBNP(1-108) conjointement à l'anticorps polyclonal anti-BNP(77-108).**

A l'aide du dosage ELISA du proBNP(1-108) décrit dans l'exemple 18, on a évalué la réaction croisée de l'anticorps anti proBNP(1-108) selon l'invention (lapin # 046 805), non épuisé, biotinylé, vis à vis du BNP(1-76) et du BNP(77-108). Des gammes de concentrations de 5ng/ml à 100ng/ml ont été réalisées avec du proBNP(1-108), du BNP(1-76) et du BNP(77-108) et testées à l'aide du dosage ELISA ProBNP(1-108) décrit dans l'exemple 18. Les résultats de la variation de la densité optique à 490nm en fonction de la concentration sont représentés dans la figure 15 pour chacune des protéines. 25 Aucune réaction croisée n'est observée vis à vis du BNP(1-76) ou du BNP(77-108) : le signal obtenu est équivalent au bruit de fond, quelle que soit la concentration testée. Aux concentrations de BNP(1-76) et de BNP(77-108) habituellement retrouvées chez les patients (de l'ordre du ng/ml pour les 30

concentrations les plus élevées), l'anticorps polyclonal du lapin # 046 805 peut être utilisé dans sa version non épuisée sans entraîner l'apparition de réaction croisée.

5                   **Exemple 20 : Evaluation de la réaction croisée, vis à vis du BNP(1-76) et du BNP(77-108), de l'anticorps polyclonal du lapin # 046 805 non épuisé couplé à la biotine, utilisé en sandwich dans le dosage ELISA proBNP(1-108) conjointement à l'anticorps polyclonal anti-NT-proBNP(1-29).**

10                  A l'aide d'un dosage ELISA du proBNP(1-108) utilisant le protocole et les réactifs décrits dans l'exemple 18, mis à part que l'anticorps polyclonal anti-BNP(77-108) est ici remplacé par un anticorps polyclonal anti-NT-proBNP(1-29), on a évalué la réaction croisée de l'anticorps polyclonal du lapin # 046 805 non épuisé, biotinylé vis à vis du BNP(1-76) et du BNP(77-108).

15                  L'anticorps polyclonal anti-NT-proBNP(1-29) a été produit selon le protocole décrit dans l'exemple 3, mis à part que le peptide utilisé comme immunogène était le peptide NT-proBNP(1-29) couplé à la KLH. Des gammes de concentrations de 5ng/ml à 100ng/ml ont été réalisées avec du proBNP(1-108), du BNP(1-76) et du BNP(77-108) et testées à l'aide du dosage ELISA du proBNP(1-108). Les résultats de la variation de la densité optique à 490nm en fonction de la concentration sont représentés dans la figure 16 pour chacune des protéines. Aucune réaction croisée de l'anticorps polyclonal du lapin #046 805 selon l'invention n'est observée vis à vis du BNP(1-76) ou du BNP(77-108), le signal obtenu est équivalent au bruit de fond, quelle que soit la concentration testée. Aux concentrations de BNP(1-76) et de BNP(77-108) habituellement retrouvées chez les patients (de l'ordre du ng/ml), l'anticorps polyclonal du lapin # 046 805 peut être utilisé dans sa version non épuisé sans entraîner l'apparition d'une réaction croisée.

20                  En résumé, il ressort clairement de tout l'exposé qui précède que la présente invention a permis de découvrir un nouvel épitope, RAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>P, situé sur la région charnière du proBNP(108) humain, d'en dériver des peptides immunogéniques le contenant, et d'obtenir des anticorps spécifiques du proBNP(108), qui ne reconnaissent substantiellement pas le BNP(1-76) et le

BNP(77-108), et dont certains d'entre eux ont la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains.

Il apparaît aussi clairement que la présente invention a permis la mise au point d'un dosage du proBNP(1-108) circulant permettant ainsi un diagnostic de l'insuffisance cardiaque de façon simple, utilisable en routine et fiable.

REVENDICATIONS

5 1. Anticorps anti proBNP(1-108) caractérisé en ce que, d'une part, il reconnaît de façon spécifique la séquence RAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>P (SEQ ID N° 5) du proBNP(1-108) et ne reconnaît实质iellement pas les peptides BNP(1-76) ni le BNP(77-108), et, d'autre part, a la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains.

10 2. Anticorps anti proBNP(1-108) selon la revendication 1 qui reconnaît de façon spécifique la séquence Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGSG<sub>85</sub> (SEQ ID N° 4) du proBNP(1-108).

15 3. Anticorps anti proBNP(1-108) selon la revendication 1 qui reconnaît de façon spécifique la séquence Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>84</sub> (SEQ ID N° 108) du proBNP(1-108).

20 4. Procédé d'obtention d'un anticorps anti proBNP(1-108) tel que défini à l'une des revendications 1, 2 et 3 dans lequel on immunise un animal avec la molécule entière de proBNP(1-108),

puis on épouse, à l'aide du peptide BNP(77-108) et/ou du peptide BNP(1-76), l'antisérum obtenu.

25 5. Procédé d'obtention d'un anticorps anti proBNP(1-108), tel que défini à l'une des revendications 1, 2 et 3, dans lequel on immunise un animal avec un peptide choisi parmi

- un peptide de formule  
a<sub>1</sub> - X<sub>1</sub> - RAPRSP - X<sub>2</sub> - a<sub>2</sub> (I)

30 où

a<sub>1</sub> peut être H ou représenter une fonction ou un groupement chimique choisi parmi une fonction thiol, alcool, aminoxy, amine primaire ou secondaire, un groupement amino-carboxyle, un groupement biotinyle et un groupement

acétyle,

X<sub>1</sub> représente une séquence peptidique de 0 à 3 acides aminés, issue de la séquence naturelle du proBNP(1-108) ou non,

X<sub>2</sub> représente une séquence peptidique de 0 à 7 acides aminés, issue de la séquence naturelle du proBNP(1-108) ou non,

a<sub>2</sub> peut représenter une fonction OH, NH<sub>2</sub> ou un groupement alcoxyle ;

- un peptide de formule

X-Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGSG<sub>85</sub>-Z (II)

où X peut être H, ou représenter soit un groupement acétyle, soit 1 à 10 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z peut représenter une fonction OH, ou 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108) ;

- un peptide de formule

X-Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>84</sub>-Z (III)

15 où X peut être H, ou représenter soit un groupement acétyle, soit 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z peut représenter une fonction OH, ou 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108) ;

- un peptide comprenant une séquence dérivée de la séquence

20 X-Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGSG<sub>85</sub>-Z (II) ou de la séquence

X-Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>84</sub>-Z (III) par substitution d'un ou plusieurs parmi les acides aminés Y<sub>70</sub>, T<sub>71</sub>, L<sub>72</sub>, K<sub>79</sub>, M<sub>80</sub>, V<sub>81</sub>, Q<sub>82</sub>, G<sub>83</sub>, S<sub>84</sub> et G<sub>85</sub>, avec X pouvant être ou représenter soit un groupement acétyle, soit 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z peut être une fonction OH, ou 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108) ;

- le peptide ayant la séquence C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G

(C13P30 : SEQ ID N° 16);

- le peptide ayant la séquence C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S

30 (CN32 : SEQ ID N° 109);

et, éventuellement, on épouse, à l'aide du peptide BNP(77-108) et/ou du peptide BNP(1-76), l'antisérum obtenu.

6. Procédé d'obtention d'hybridome sécréteur d'un anticorps anti proBNP(1-108), tel que défini à l'une des revendications 1, 2 et 3, dans lequel on immunise un animal avec un peptide choisi parmi

- un peptide de formule

5  $a_1 - X_1 - RAPRSP - X_2 - a_2$  (I)

où

a<sub>1</sub> peut être H ou représenter une fonction ou un groupement chimique choisi parmi une fonction thiol, alcool, aminoxy, amine primaire ou secondaire, un groupement amino-carboxyle, un groupement biotinyle et un groupement acétyle,

10 X<sub>1</sub> représente une séquence peptidique de 0 à 3 acides aminés, issue de la séquence naturelle du proBNP(1-108) ou non,

X<sub>2</sub> représente une séquence peptidique de 0 à 7 acides aminés, issue de la séquence naturelle du proBNP(1-108) ou non,

15 a<sub>2</sub> peut représenter une fonction OH, NH<sub>2</sub> ou un groupement alcoxyle ;

- un peptide de formule

X-Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGSG<sub>85</sub>-Z (II)

où X peut être H, ou représenter soit un groupement acétyle, soit 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z peut représenter une fonction OH, ou 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108) ;

- un peptide de formule

X-Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>84</sub>-Z (III)

où X peut être H, ou représenter soit un groupement acétyle, soit 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z peut représenter une fonction OH, ou 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108) ;

- un peptide comprenant une séquence dérivée de la séquence

25 X-Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGSG<sub>85</sub>-Z (II) ou de la séquence

30 X-Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>84</sub>-Z (III) par substitution d'un ou plusieurs parmi les acides aminés Y<sub>70</sub>, T<sub>71</sub>, L<sub>72</sub>, K<sub>79</sub>, M<sub>80</sub>, V<sub>81</sub>, Q<sub>82</sub>, G<sub>83</sub>, S<sub>84</sub> et G<sub>85</sub>, avec X pouvant être ou représenter soit un groupement acétyle, soit 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z peut être

une fonction OH, ou 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108) ;

- le peptide ayant la séquence C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G (C13P30 : SEQ ID N° 16);

5 - le peptide ayant la séquence C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S (CN32 : SEQ ID N° 109);

on prélève des lymphocytes sécrétateurs d'immunoglobulines de cet animal,

10 et on procède à une fusion des lymphocytes avec des cellules de myélome pour obtenir au moins un hybridome sécréteur d'immunoglobuline.

7. Procédé selon l'une des revendications 5 et 6, dans lequel le peptide de formule (II) a la séquence Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGSG<sub>85</sub> (SEQ ID N° 4).

15

8. Procédé selon l'une des revendications 5 et 6, dans lequel le peptide de formule (III) a la séquence Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>84</sub> (SEQ ID N° 108)

20

9. Hybridome susceptible d'être produit par le procédé selon l'une des revendications 6, 7 et 8.

10. Anticorps monoclonal anti proBNP(1-108) sécrété par un hybridome selon la revendication 9.

25

11. Méthode de diagnostic *in vitro* de l'insuffisance cardiaque chez un humain comprenant la mise en contact d'un échantillon biologique avec un anticorps anti proBNP(1-108) tel que défini dans l'une des revendications 1, 2, 3, et 10, et la détection du proBNP(1-108) dans l'échantillon.

30

12. Méthode de diagnostic *in vitro* de l'insuffisance cardiaque chez un humain comprenant :

a) la mise en contact d'un échantillon biologique avec un anticorps anti

proBNP(1-108) tel que défini à l'une des revendications 1, 2, 3, et 10,

b) l'incubation du mélange dans des conditions permettant la formation de complexes antigènes-anticorps ; et

c) la révélation des complexes antigènes-anticorps formés,

5 éventuellement à l'aide d'un anticorps de détection, marqué, capable de se lier spécifiquement au proBNP(1-108) présent dans le premier complexe, ou à l'aide d'un antigène de détection, marqué, capable de se lier à l'anticorps dirigé contre ledit proBNP(1-108) présent dans le premier complexe.

10 13. Méthode de diagnostic selon la revendication 12 qui comprend en plus une étape d) de corrélation de la quantité des complexes antigènes-anticorps révélés à l'état clinique du sujet.

15 14. Trousse de détection du proBNP(1-108) dans un échantillon biologique, contenant au moins un anticorps tel que défini dans l'une des revendications 1, 2, 3, et 10.

15. Trousse de détection du proBNP(1-108) dans un échantillon biologique selon la revendication 14, contenant :

20 (i) dans un récipient, au moins un anticorps tel que défini dans l'une des revendications 1, 2, 3, et 10;

(ii) dans un autre récipient au moins un peptide choisi parmi

- un peptide de formule

a<sub>1</sub> - X<sub>1</sub> - RAPRSP - X<sub>2</sub> - a<sub>2</sub> (I)

25 où

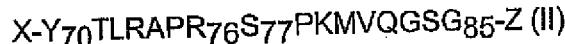
a<sub>1</sub> peut être H ou représenter une fonction ou un groupement chimique choisi parmi une fonction thiol, alcool, aminoxy, amine primaire ou secondaire, un groupement amino-carboxyle, un groupement biotinyle et un groupement acétyle,

30 X<sub>1</sub> représente une séquence peptidique de 0 à 3 acides aminés, issue de la séquence naturelle du proBNP(1-108) ou non,

X<sub>2</sub> représente une séquence peptidique de 0 à 7 acides aminés, issue de la séquence naturelle du proBNP(1-108) ou non,

$a_2$  peut représenter une fonction OH, NH<sub>2</sub> ou un groupement alcoxyle ;

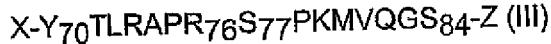
- un peptide de formule



où X peut être H, ou représenter soit un groupement acétyle, soit 1 à

5 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z peut représenter une fonction OH, ou 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108) ;

- un peptide de formule



10 où X peut être H, ou représenter soit un groupement acétyle, soit 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z peut représenter une fonction OH, ou 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108) ;

- un peptide comprenant une séquence dérivée de la séquence



15 X-Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>84</sub>-Z (III) par substitution d'un ou plusieurs parmi les acides aminés Y<sub>70</sub>, T<sub>71</sub>, L<sub>72</sub>, K<sub>79</sub>, M<sub>80</sub>, V<sub>81</sub>, Q<sub>82</sub>, G<sub>83</sub>, S<sub>84</sub> et G<sub>85</sub>, avec X pouvant être ou représenter soit un groupement acétyle, soit 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z peut représenter une fonction OH, ou 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108) ;

- le peptide ayant la séquence Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGSG<sub>85</sub> (SEQ

ID N° 4) ;

- le peptide ayant la séquence Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>84</sub> (SEQ

25 ID N° 109) ;

- le peptide ayant la séquence C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G

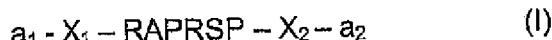
(C13P30 : SEQ ID N° 16) ;

- le peptide ayant la séquence C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S

(CN32 : SEQ ID N° 108).

30

16. Peptide de formule :



où

a<sub>1</sub> peut être H ou représenter une fonction ou un groupement chimique choisi parmi une fonction thiol, alcool, aminoxy, amine primaire ou secondaire, un groupement amino-carboxyle, un groupement biotinyle et un groupement acétyle,

5 X<sub>1</sub> représente une séquence peptidique de 0 à 3 acides aminés, issue de la séquence naturelle du proBNP(1-108) ou non,

X<sub>2</sub> représente une séquence peptidique de 0 à 7 acides aminés, issue de la séquence naturelle du proBNP(1-108) ou non,

a<sub>2</sub> peut représenter une fonction OH, NH<sub>2</sub> ou un groupement alcoxyle.

10

17. Peptide de formule :

X-Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGSG<sub>85</sub>-Z (II)

15

où X peut être H, ou représenter soit un groupement acétyle, soit 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z peut représenter une fonction OH, ou 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108).

20

18. Peptide selon la revendication 17, ayant la séquence Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGSG<sub>85</sub> (SEQ ID N° 4).

19. Peptide de formule :

X-Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>84</sub>-Z (III)

25

où X peut être H, ou représenter soit un groupement acétyle, soit 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z peut représenter une fonction OH, ou 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108).

30

20. Peptide selon la revendication 19, ayant la séquence Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>84</sub> (SEQ ID N° 108).

21. Peptide comprenant une séquence dérivée de la séquence

X-Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGSG<sub>85</sub>-Z (II) ou de la séquence

X-Y<sub>70</sub>TLRAPR<sub>76</sub>S<sub>77</sub>PKMVQGS<sub>84</sub>-Z (III) par substitution d'un ou

plusieurs parmi les acides aminés Y<sub>70</sub>, T<sub>71</sub>, L<sub>72</sub>, K<sub>79</sub>, M<sub>80</sub>, V<sub>81</sub>, Q<sub>82</sub>, G<sub>83</sub>, S<sub>84</sub> et G<sub>85</sub>, avec X pouvant être ou représenter soit un groupement acétyle, soit 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108), et où Z peut être une fonction OH, ou 1 à 3 acides aminés n'appartenant pas à la séquence du proBNP(1-108).

5 22. Peptide selon la revendication 16, ayant une séquence choisie dans

le groupe constitué par les séquences suivantes

SEQ ID N° 16 : C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G (peptide C13P30)

10 SEQ ID N° 109 : C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S (peptide CN32)

SEQ ID N° 6 : C-G-R-A-P-R-S-P

SEQ ID N° 7 : Acétyl -C-G-R-A-P-R-S-P

SEQ ID N° 8: C-G-R-A-P-R-S-P-K

SEQ ID N° 9: Acétyl -C-G-R-A-P-R-S-P-K

15 SEQ ID N° 10: C-G-R-A-P-R-S-P-K-M-V

SEQ ID N° 11: C-G-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G

SEQ ID N° 12 : R-A-P-R-S-P-G-C

SEQ ID N° 13 : Acétyl -R-A-P-R-S-P-G-C

SEQ ID N° 110 : C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K

20 SEQ ID N° 111: C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V

SEQ ID N° 112 : C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q

SEQ ID N° 113 : C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G

SEQ ID N° 19 : C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-βA

SEQ ID N° 20 : C-Y-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-A-T-βA

25 SEQ ID N° 114 : Acétyl-C-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q

SEQ ID N° 115 : C-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G

SEQ ID N° 116 : C-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S

SEQ ID N° 117 : C-T-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G

SEQ ID N° 118 : C-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V

30 SEQ ID N° 119 : C-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q

SEQ ID N° 120 : L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-C

SEQ ID N° 121 : C-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S

SEQ ID N° 122 : C-L-R-A-P-R-S-P-K-M-V-Q-G-S-G

23. Procédé d'obtention d'anticorps anti proBNP(1-108) reconnaissant de façon spécifique la séquence  $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGSG_{85}$ , la séquence  $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}$  et/ou la séquence  $RAPR_{76}S_{77}P$  du proBNP(1-108) à l'exclusion substantielle des peptides BNP(1-76) et BNP(77-108), et ayant la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains, procédé dans lequel on immunise un animal avec un peptide tel que défini dans l'une des revendications 16 à 22,

10 et, éventuellement, on épouse, à l'aide du peptide BNP(77-108) et/ou du peptide BNP(1-76), l'antisérum obtenu.

24. Procédé d'obtention d'hybridome sécréteur d'un anticorps anti proBNP(1-108), reconnaissant de façon spécifique la séquence  $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGSG_{85}$ , la séquence  $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}$

15 et/ou la séquence  $RAPR_{76}S_{77}P$  du proBNP(1-108) à l'exclusion substantielle des peptides BNP(1-76) et BNP(77-108), et ayant la capacité de reconnaître spécifiquement le proBNP(1-108) circulant dans des échantillons sériques ou plasmatiques humains, procédé dans lequel on immunise un animal avec un peptide tel que défini dans l'une des revendications 16 à 22,

20 on prélève des lymphocytes sécréteurs d'immunoglobulines de cet animal,

25 et on procède à une fusion des lymphocytes avec des cellules de myélome pour obtenir au moins un hybridome sécréteur d'immunoglobuline.

25. Anticorps anti proBNP(1-108), caractérisé en ce qu'il est obtenu par un procédé selon la revendication 23.

30 26. Anticorps anti proBNP(1-108) selon la revendication 25, qui reconnaît de façon spécifique la séquence  $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGSG_{85}$  ou la séquence  $Y_{70}TLRAPR_{76}S_{77}PKMVQGS_{84}$  du proBNP(1-108).

27. Hybridome susceptible d'être produit par le procédé selon la

revendication 24.

28. Anticorps monoclonal anti proBNP(1-108) sécrété par un hybridome selon la revendication 27.

5

29. Anticorps monoclonal anti proBNP(1-108) selon la revendication 28 sécrété par l'hybridome 3D4 déposé à la CNCM sous le N°CNCM I-3073.

10

30. Méthode de diagnostic *in vitro* de l'insuffisance cardiaque chez un humain comprenant la mise en contact d'un échantillon biologique avec un anticorps anti proBNP(1-108) tel que défini dans l'une quelconque des revendications 25, 26, 28, et 29, et la détection du proBNP(1-108) dans l'échantillon.

15

31. Méthode de diagnostic *in vitro* de l'insuffisance cardiaque chez un humain comprenant :

- a) la mise en contact d'un échantillon biologique avec un anticorps anti proBNP(1-108) tel que défini à l'une des revendications 25, 26, 28, et 29,
- b) l'incubation du mélange dans des conditions permettant la formation de complexes antigènes-anticorps ; et
- c) la révélation des complexes antigènes-anticorps formés, éventuellement à l'aide d'un anticorps de détection, marqué, capable de se lier spécifiquement au proBNP(1-108) présent dans le premier complexe, ou à l'aide d'un antigène de détection, marqué, capable de se lier à l'anticorps dirigé contre ledit proBNP(1-108) présent dans le premier complexe.

25

30

32. Méthode de diagnostic selon la revendication 31 qui comprend en plus une étape d) de corrélation de la quantité des complexes antigènes-anticorps révélés à l'état clinique du sujet.

33. Trousse de détection du proBNP(1-108) dans un échantillon biologique, contenant au moins un anticorps tel que défini dans l'une des revendications 25, 26, 28, et 29.

5

34. Trousse de détection du proBNP(1-108) dans un échantillon biologique, contenant, comme étalon et/ou témoin, au moins un peptide tel que défini dans l'une des revendications 16 à 22.

10

35. Trousse de détection du proBNP(1-108) dans un échantillon biologique, contenant :

- dans un récipient, au moins un anticorps tel que défini dans l'une des revendications 25, 26, 28, et 29;
- dans un autre récipient au moins un peptide tel que défini dans l'une des revendications 16 à 22.

15

1/16

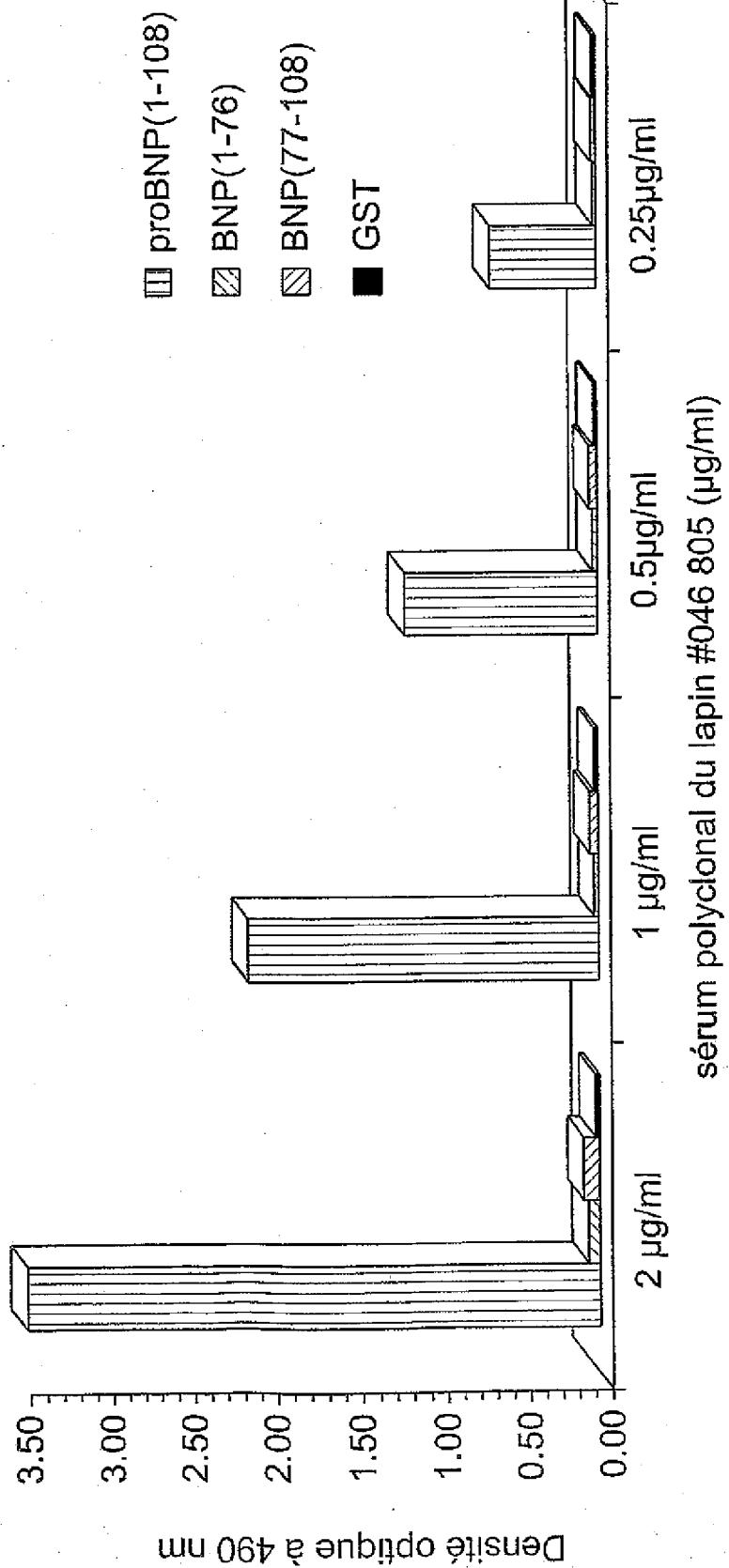
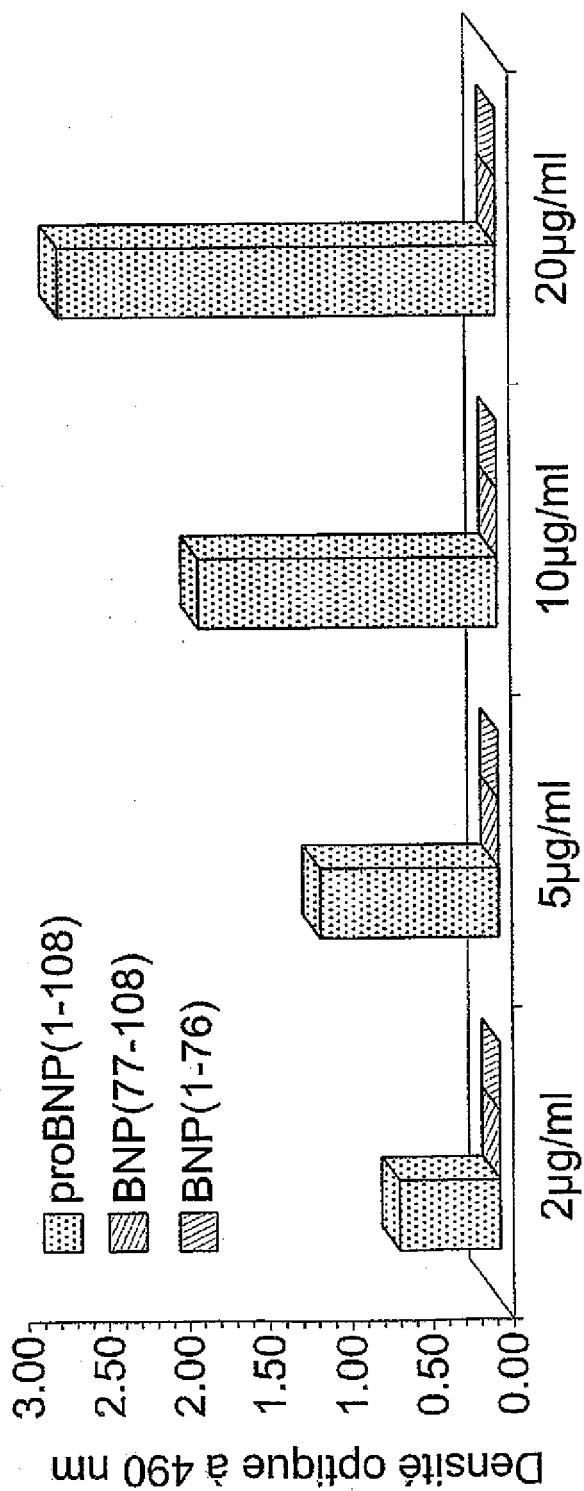


FIG.1

2/16



Filtrat du sérum polyclonal du lapin #046 805 (µg/ml)

**FIG.2**

3/16

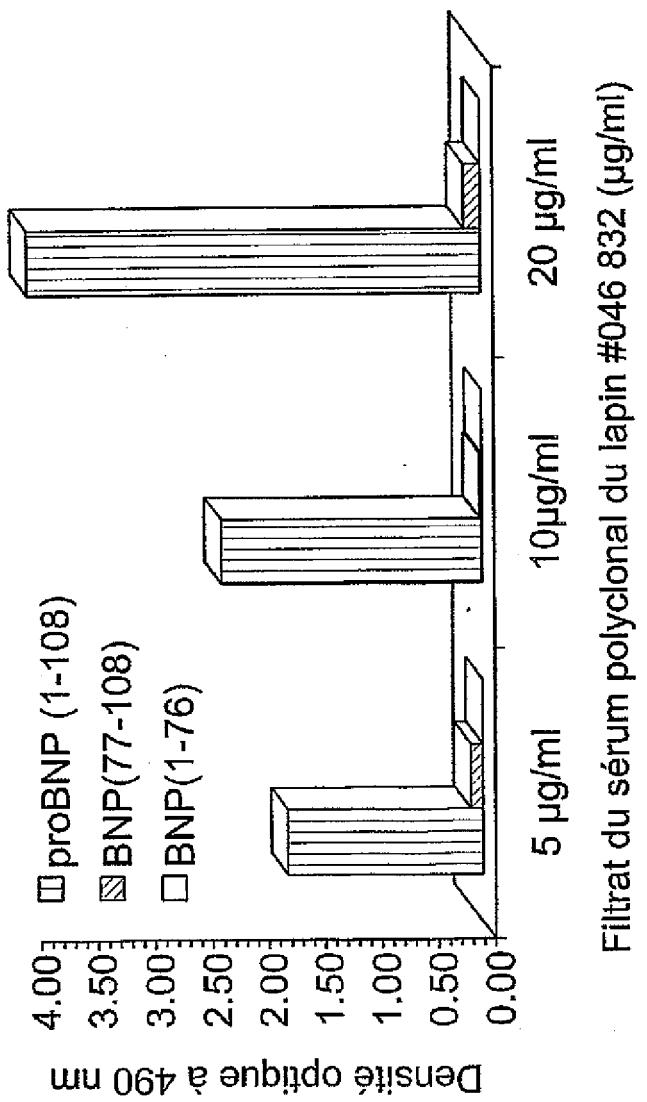
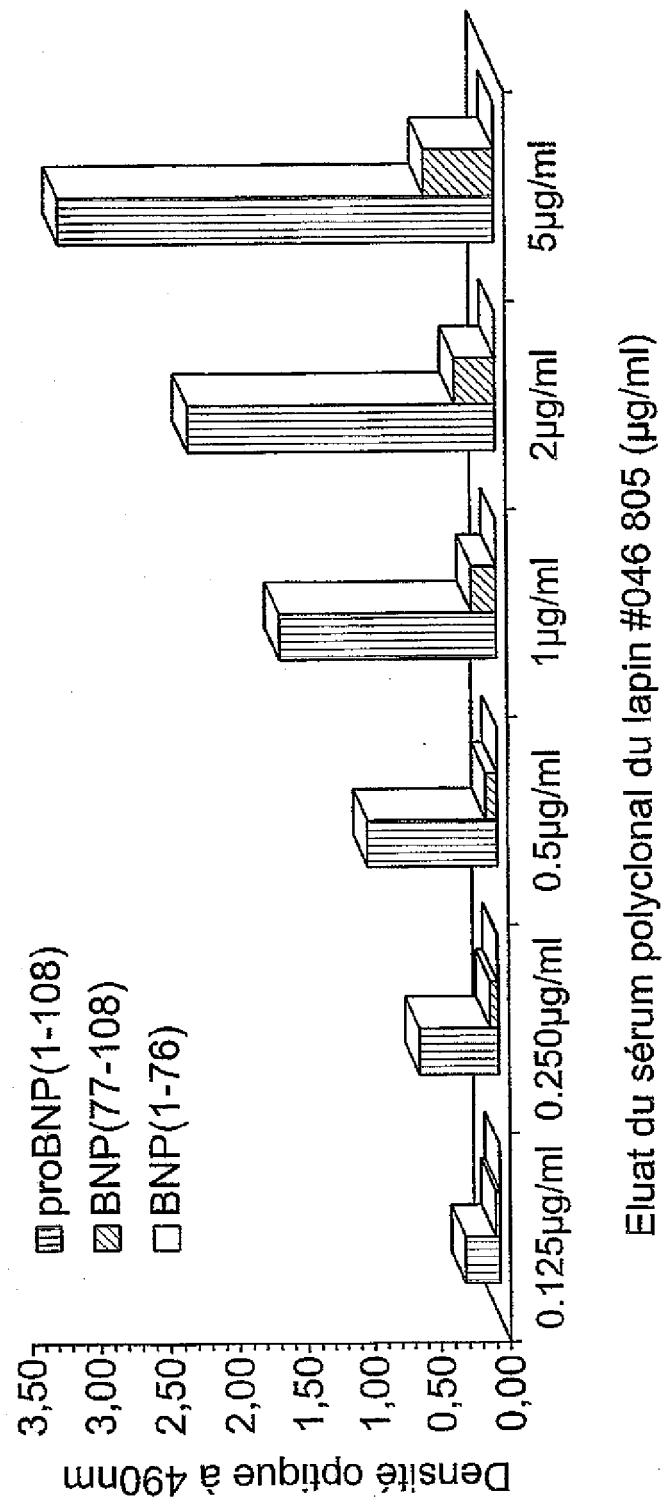
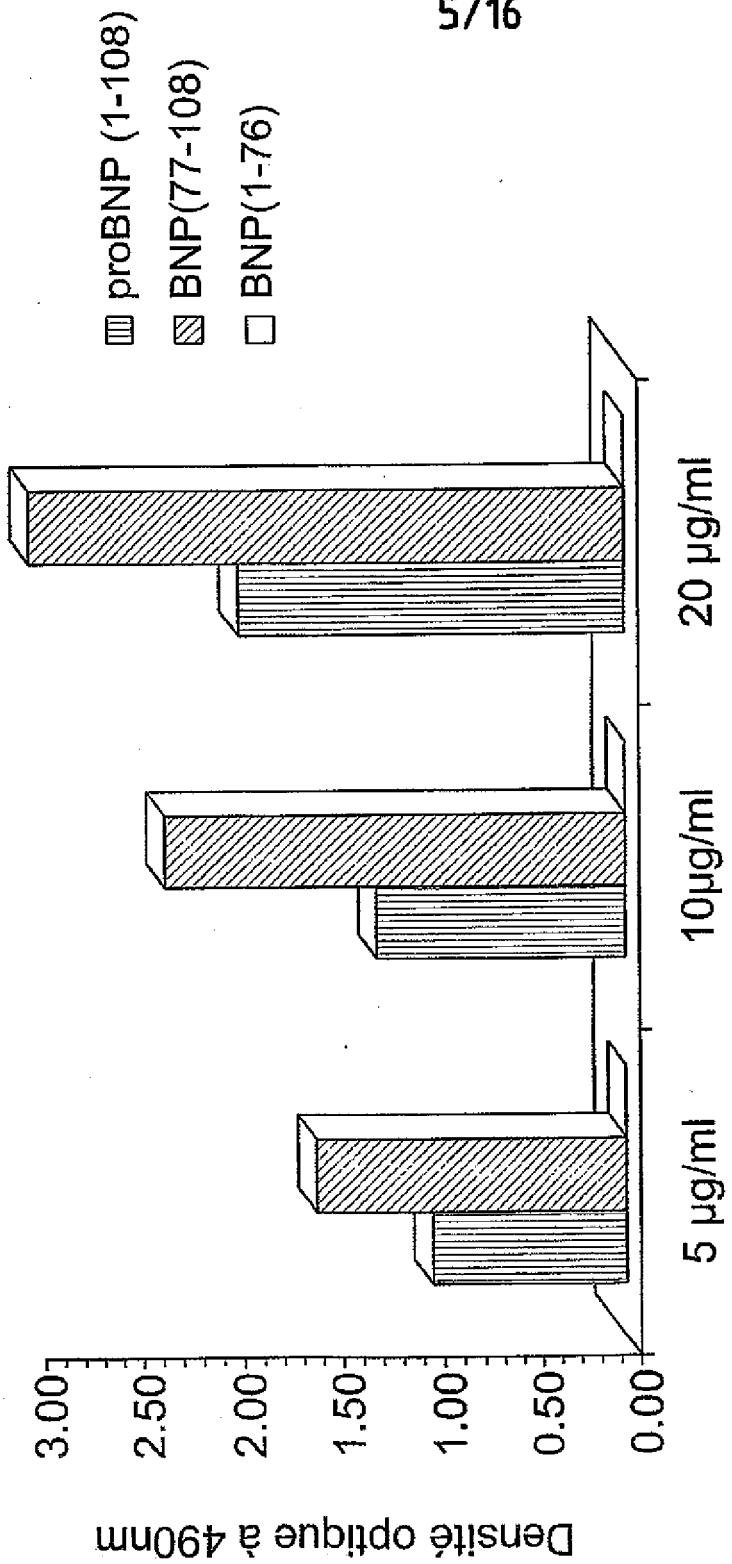


FIG.3

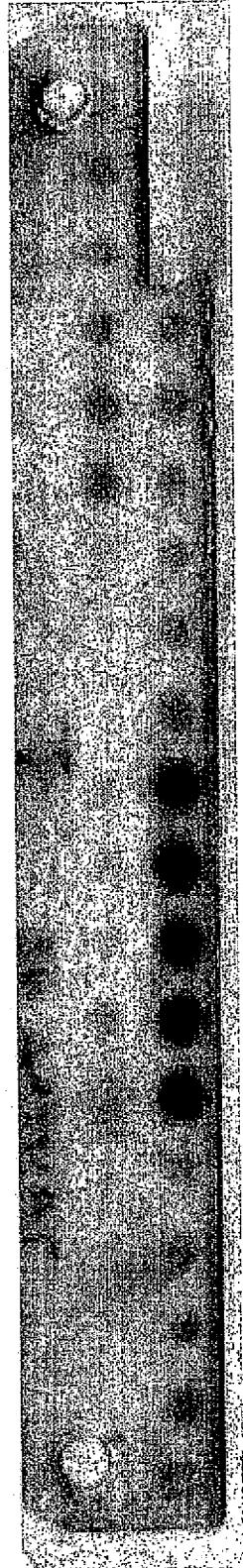
4/16

FIG.4

5/16

Eluat du sérum polyclonal du lapin #046 832 ( $\mu\text{g/ml}$ )**FIG.5**

6/16



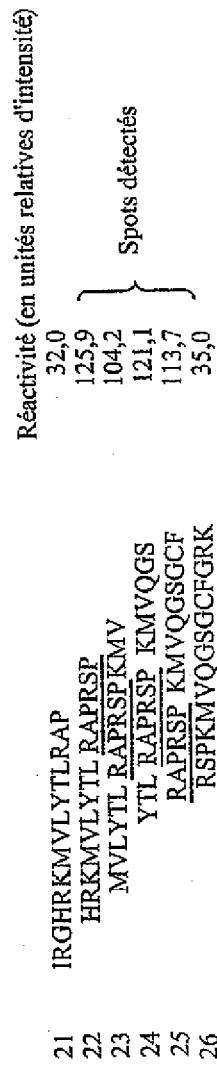
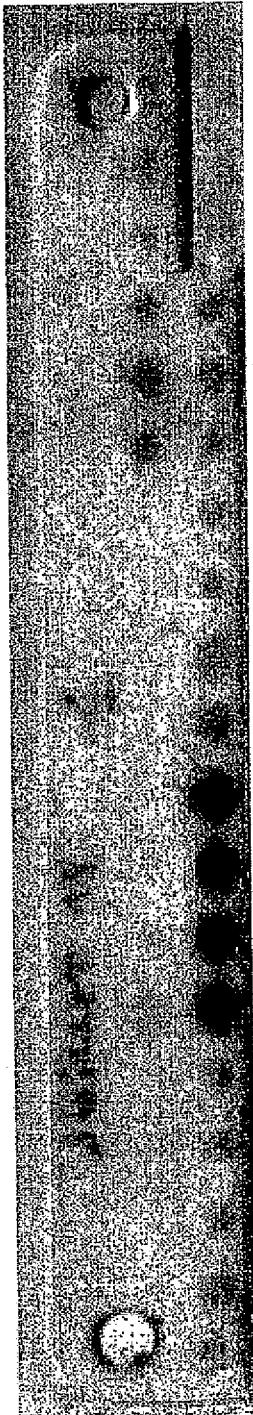
Réactivité (en unités relatives d'intensité) :

21	IRGHHRKMWLYTLRAP	32.8
22	HRKMWLYTLRAPRSP	104.8
23	MWLYTLRAPRSPKMW	99.2
24	YTLRAPRSPKMWQGS	117.5
25	RAPRSPKMWQGSGCF	119.0
26	RSPKMWQGSGCFGRK	84.5
27	KMVQGSGCFGRKMDR	33.0

Spots détectés

**FIG.6**

7/16

**FIG.7**

8/16

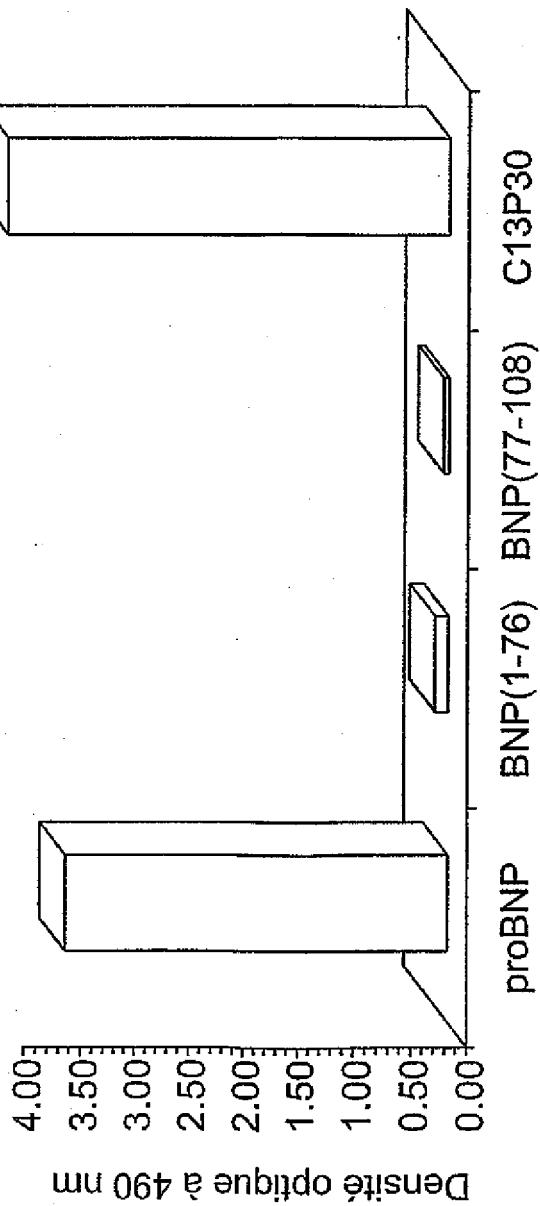


FIG. 8

9/16

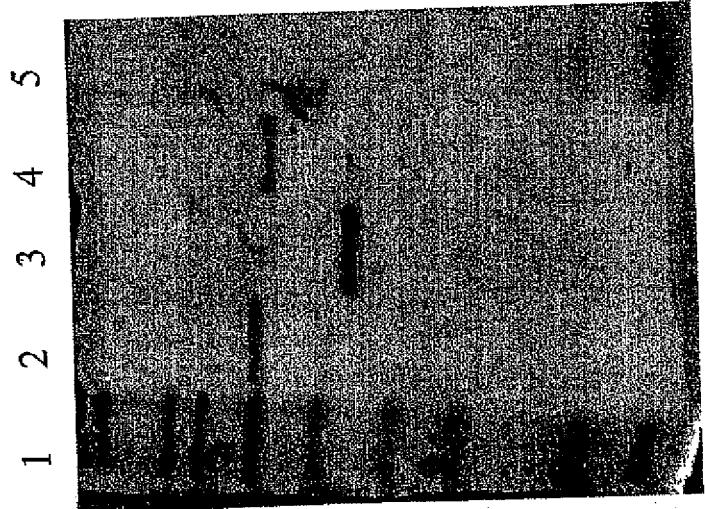


FIG. 9

10/16

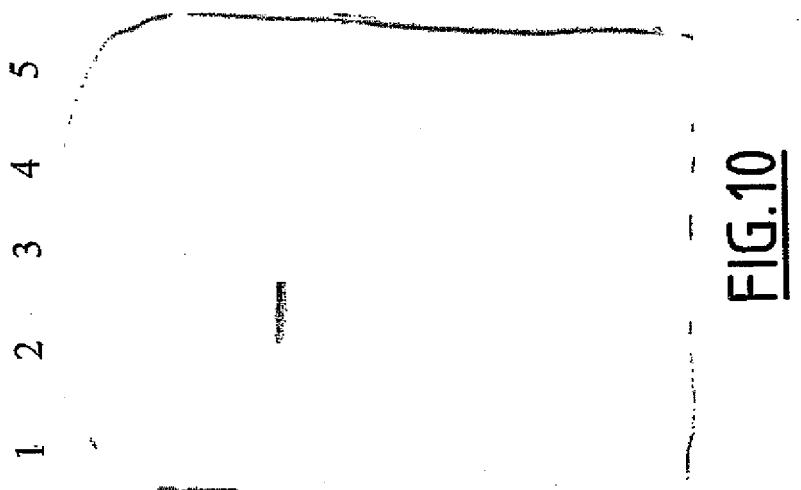


FIG.10

11/16

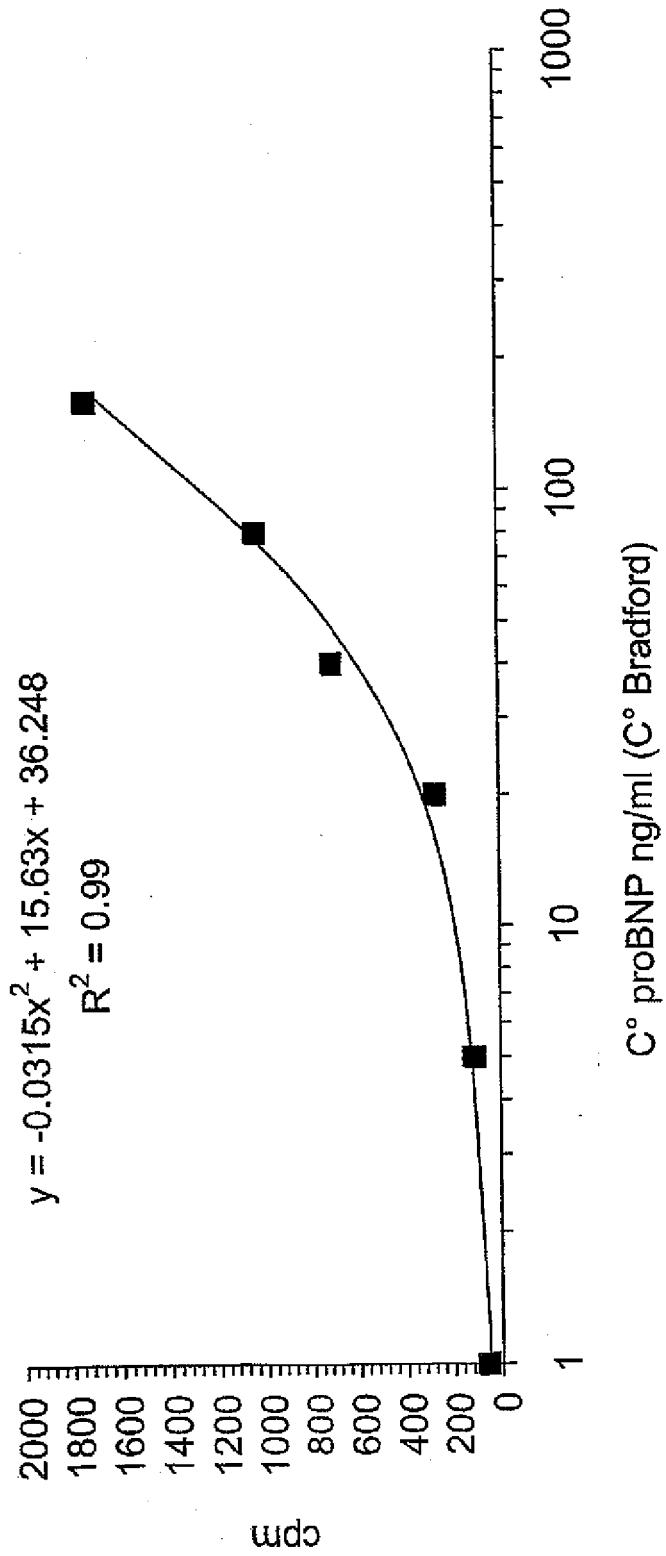


FIG.11

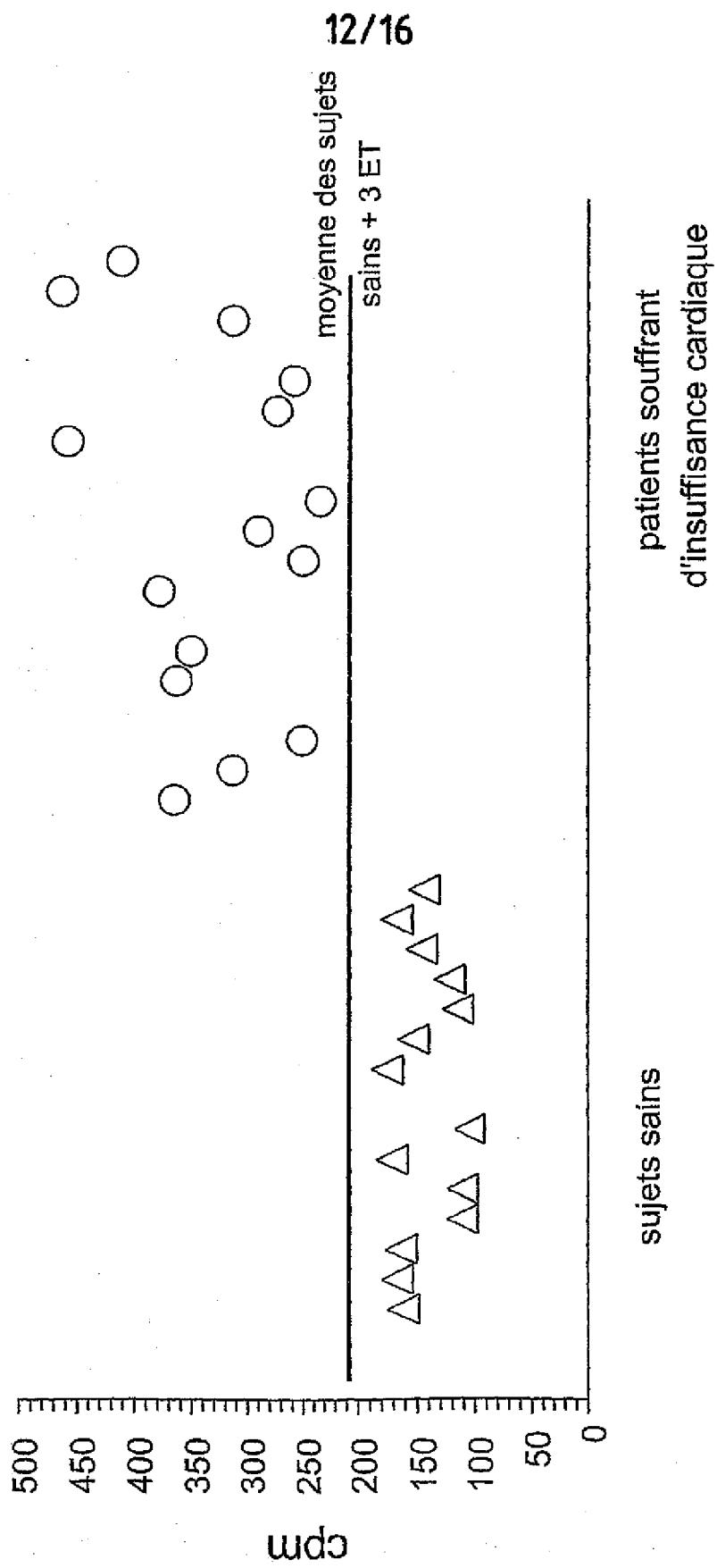


FIG.12

13/16

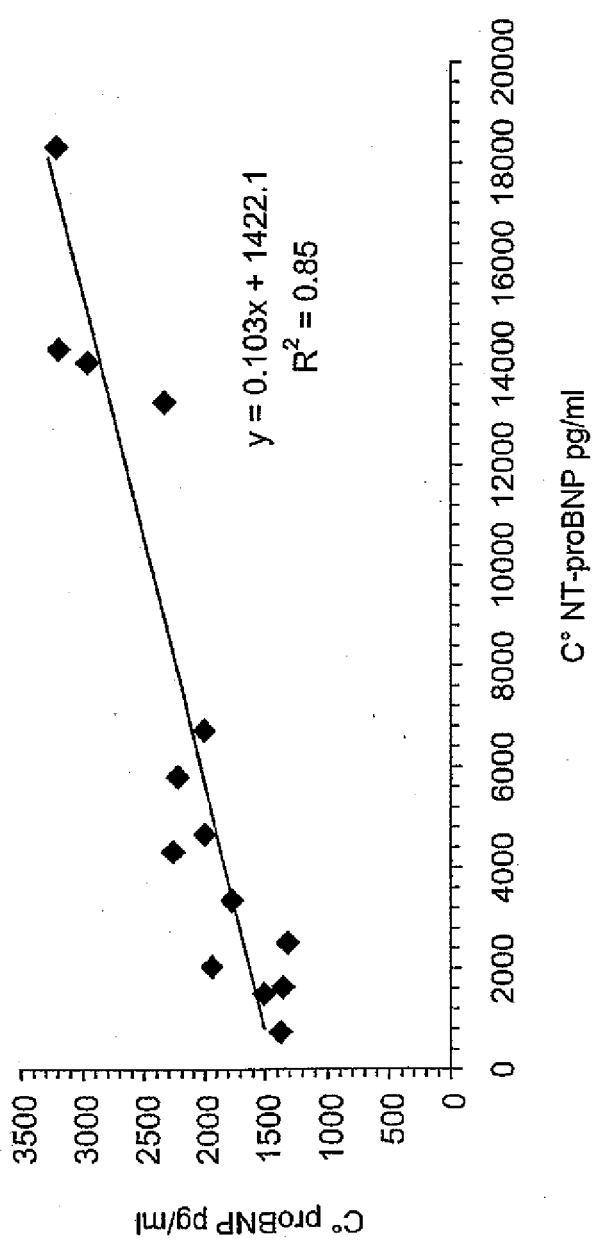


FIG.13

14/16

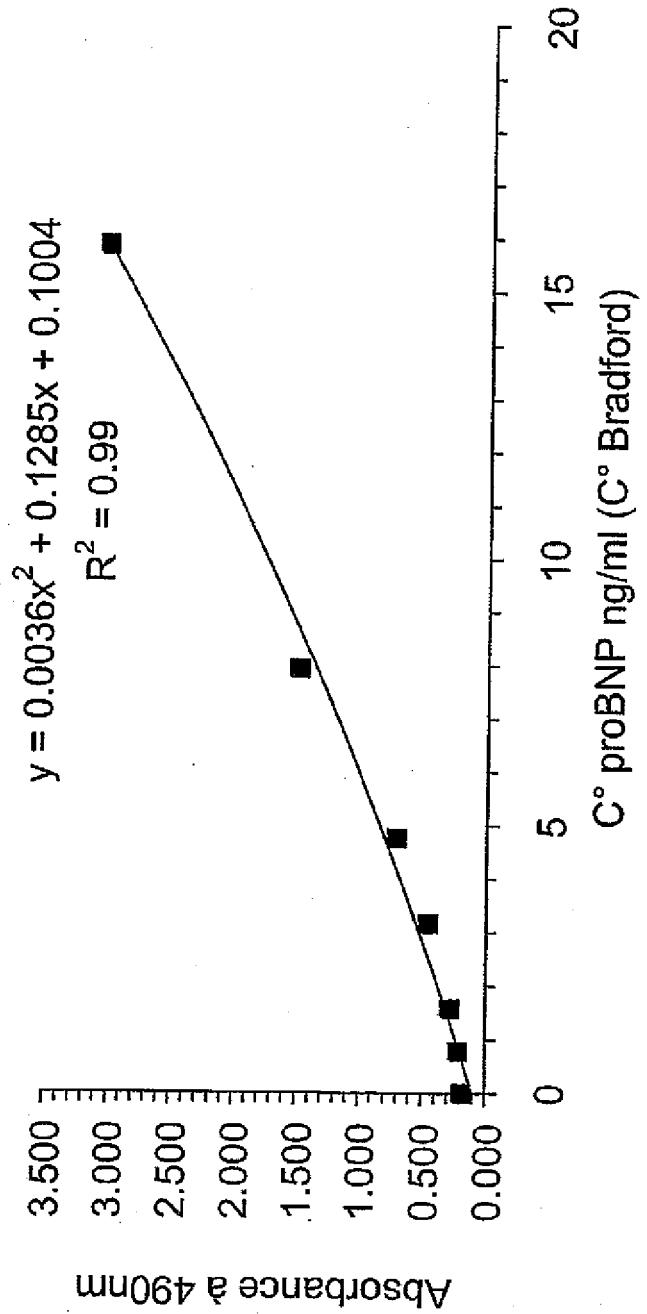


FIG. 14

15/16

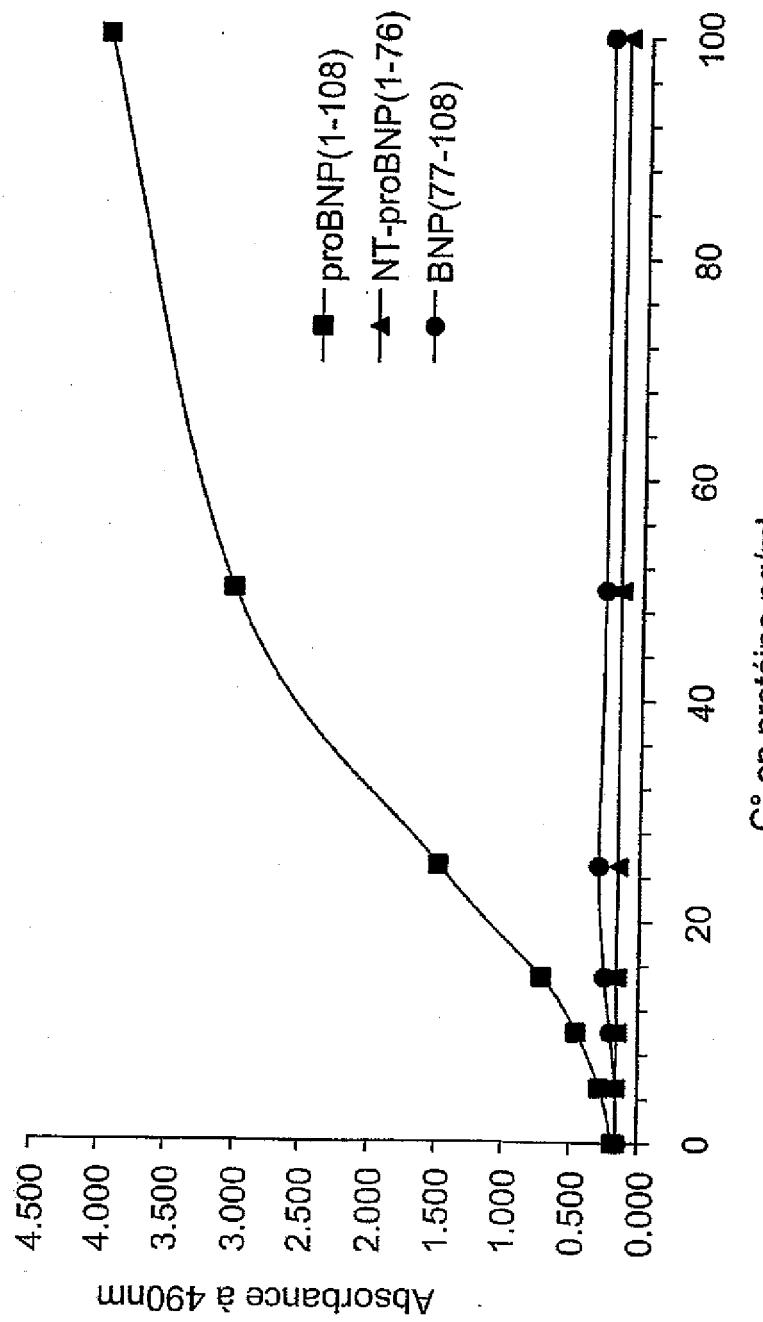


FIG. 15

16/16

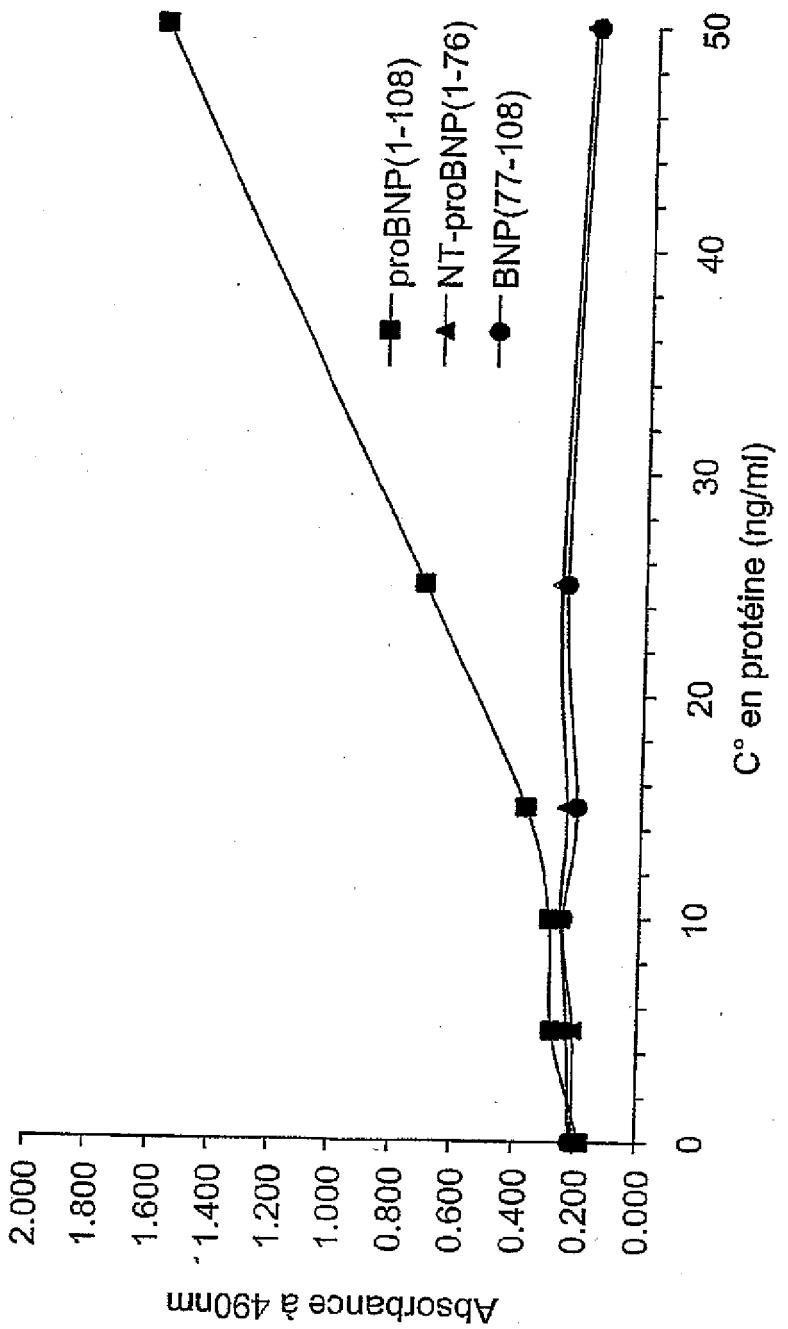


FIG.16

## SEQUENCE LISTING

<110> BIO-RAD PASTEUR  
CNRS

Université de Montpellier

<120> Anticorps spécifiques pour le diagnostic de l'insuffisance cardiaque

<130> BET 03P0750

<150> FR 0210063

<151> 2002-08-07

<160> 124

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens : proBNP(1-108)

<400> 1

His Pro Leu Gly Ser Pro Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly  
1 5 10 15

Leu Gln Glu Gln Arg Asn His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln  
20 25 30

Val Glu Gln Thr Ser Leu Glu Pro Leu Gln Glu Ser Pro Arg Pro Thr  
35 40 45

Gly Val Trp Lys Ser Arg Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile Arg Gly His  
50 55 60

Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met  
55 70 75 80

Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp Arg Ile Ser Ser  
85 90 95

Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg His  
100 105

<210> 2

<211> 32

<212> PRT

<213> Homo sapiens : proBNP(77-108)

<400> 2

Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp  
1 5 10 15

Arg Ile Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg His  
20 25 30

<210> 3

<211> 76

<212> PRT

<213> Homo sapiens : proBNP(1-76)

<400> 3

His Pro Leu Gly Ser Pro Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly  
1 5 10 15

Leu Gln Glu Gln Arg Asn His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln  
20 25 30

Val Glu Gln Thr Ser Leu Glu Pro Leu Gln Glu Ser Pro Arg Pro Thr  
35 40 45

Gly Val Trp Lys Ser Arg Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile Arg Gly His  
50 55 60

Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg

65 70 75

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : proBNP(70-85)

<400> 4

Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly  
1 5 10 15

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : proBNP(73-78)

<400> 5

Arg Ala Pro Arg Ser Pro  
1 5

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 6

Cys Gly Arg Ala Pro Arg Ser Pro  
1 5

<210> 7

<211> 8

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) .. (1)

<223> ACETYLATION

<400> 7

Cys Gly Arg Ala Pro Arg Ser Pro  
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 8

Cys Gly Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys  
1 5

<210> 9

<211> 9

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) .. (1)

<223> ACETYLATION

<400> 9

Cys Gly Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys  
1 5

<210> 10

<211> 11

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 10

Cys Gly Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val  
1 5 10

<210> 11

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 11

Cys Gly Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly  
1 5 10 15

<210> 12

<211> 8

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 12

Arg Ala Pro Arg Ser Pro Gly Cys  
1 5

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) .. (1)

<223> ACETYLATION

<400> 13

Arg Ala Pro Arg Ser Pro Gly Cys  
1 5

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1) .. (1)

<223> ACETYLATION

<400> 14

Cys Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys  
1 5 10

<210> 15

<211> 17

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 15

Cys His Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro  
1 5 10 15

Lys

<210> 16

<211> 17

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 16

Cys Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser  
1 5 10 15

Gly

<210> 17

<211> 17

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 17

Cys Phe Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser  
1 5 10 15

Gly

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 18

Cys Phe Ser Ile Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser  
1 5 10 15

Gly

<210> 19

<211> 17

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (17) .. (17)

<223> bAla

<400> 19

Cys Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser  
1 5 10 15

Ala

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (17) .. (17)

<223> bAla

<400> 20

Cys Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Ala Thr  
1 5 10 15

Ala

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MOD\_RES

&lt;222&gt; (17) .. (17)

&lt;223&gt; bAla

&lt;400&gt; 21

Cys Phe Ser Ile Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Ala Thr  
1 5 10 15

Ala

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Séquence artificielle : peptide

&lt;400&gt; 22

Cys Phe Ser Ile Arg Ala Pro Arg Ser Pro Ala Leu Ala Ser Gly Thr  
1 5 10 15

Ala

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Séquence artificielle : peptide

&lt;400&gt; 23

His Pro Leu Gly Ser Pro Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser  
1 5 10 15

&lt;210&gt; 24

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 24

Gly Ser Pro Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly Leu Gln  
1 5 10 15

<210> 25

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 25

Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly Leu Gln Glu Gln Arg  
1 5 10 15

<210> 26

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 26

Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly Leu Gln Glu Gln Arg Asn His Leu  
1 5 10 15

<210> 27

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 27

Glu Thr Ser Gly Leu Gln Glu Gln Arg Asn His Leu Gln Gly Lys  
1 5 10 15

<210> 28

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 28

Gly Leu Gln Glu Gln Arg Asn His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu  
1 5 10 15

<210> 29

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 29

Glu Gln Arg Asn His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln Val  
1 5 10 15

<210> 30

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 30

Asn His Leu Gln Glu Lys Leu Ser Glu Leu Gln Val Glu Gln Thr  
1 5 10 15

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 31

Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln Val Glu Gln Thr Ser Leu Glu  
1 5 10 15

<210> 32

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 32

Leu Ser Glu Leu Gln Val Glu Gln Thr Ser Leu Glu Pro Leu Gln  
1 5 10 15

<210> 33

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 33

Leu Gln Val Glu Gln Thr Ser Leu Glu Pro Leu Gln Glu Ser Pro  
1 5 10 15

<210> 34

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 34

Glu Gln Thr Ser Leu Glu Pro Leu Gln Glu Ser Pro Arg Pro Thr  
1 5 10 15

<210> 35

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 35

Ser Leu Glu Pro Leu Gin Glu Ser Pro Arg Pro Thr Gly Val Trp  
1 5 10 15

<210> 36

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 36

Pro Leu Gln Glu Ser Pro Arg Pro Thr Gly Val Trp Lys Ser Arg  
1 5 10 15

<210> 37

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 37

Glu Ser Pro Arg Pro Thr Gly Val Trp Lys Ser Arg Glu Val Ala  
1 5 10 15

<210> 38

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 38

Arg Pro Thr Gly Val Trp Lys Ser Arg Glu Val Ala Thr Glu Gly  
1 5 10 15

<210> 39

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 39

Gly Val Trp Lys Ser Arg Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile Arg Gly  
1 5 10 15

<210> 40

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 40

Lys Ser Arg Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile Arg Gly His Arg Lys  
1 5 10 15

<210> 41

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 41

Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile Arg Gly His Arg Lys Met Val Leu  
1 5 10 15

<210> 42

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 42

Thr Glu Gly Ile Arg Gly His Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu  
1 5 10 15

<210> 43

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 43

Ile Arg Gly His Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro  
1 5 10 15

<210> 44

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 44

His Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro  
1 5 10 15

<210> 45

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 45

Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val  
1 5 10 15

<210> 46

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 46

Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser  
1 5 10 15

<210> 47

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 47

Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe  
1 5 10 15

<210> 48

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 48

Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Lys  
1 5 10 15

<210> 49

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 49

Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp Arg  
1 5 10 15

<210> 50

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 50

Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp Arg Ile Ser Ser

1 5 10 15

<210> 51

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 51

Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp Arg Ile Ser Ser Ser Gly  
1 5 10 15

<210> 52

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 52

Gly Arg Lys Met Asp Arg Ile Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys  
1 5 10 15

<210> 53

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 53

Met Asp Arg Ile Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu  
1 5 10 15

<210> 54

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 54

Ile Ser Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg His  
1 5 10 15

<210> 55

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 55

Ala Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser  
1 5 10 15

<210> 56

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 56

Tyr Ala Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser  
1 5 10 15

<210> 57

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 57

Tyr Thr Ala Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser  
1 5 10 15

<210> 58

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 58

Tyr Thr Leu Ala Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser  
1 5 10 15

<210> 59

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 59

Tyr Thr Leu Arg Gly Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser  
1 5 10 15

<210> 60

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 60

Tyr Thr Leu Arg Ala Ala Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser  
1 5 10 15

<210> 61

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 61

Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Ala Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser  
1 5 10 15

<210> 62

<211> 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Séquence artificielle : peptide

&lt;400&gt; 62

Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ala Pro Lys Met Val Gln Gly Ser  
1 5 10 15

&lt;210&gt; 63

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Séquence artificielle : peptide

&lt;400&gt; 63

Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Ala Lys Met Val Gln Gly Ser  
1 5 10 15

&lt;210&gt; 64

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Séquence artificielle : peptide

&lt;400&gt; 64

Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Ala Met Val Gln Gly Ser  
1 5 10 15

&lt;210&gt; 65

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Séquence artificielle : peptide

&lt;400&gt; 65

Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Pro Lys Ala Val Gln Gly Ser  
1 5 10 15

&lt;210&gt; 66

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 66

Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Ala Gln Gly Ser  
1 5 10 15

<210> 67

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 67

Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Ala Gly Ser  
1 5 10 15

<210> 68

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 68

Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Ala Ser  
1 5 10 15

<210> 69

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 69

Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ala  
1 5 10 15

<210> 70

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 70

Pro Leu Gly Ser Pro Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly  
1 5 10 15

<210> 71

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 71

Leu Gly Ser Pro Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly Leu  
1 5 10 15

<210> 72

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 72

Ser Pro Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly Leu Gln Glu  
1 5 10 15

<210> 73

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 73

Pro Gly Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly Leu Gln Glu Gln  
1 5 10 15

<210> 74

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 74

Ser Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly Leu Gln Glu Gln Arg Asn  
1 5 10 15

<210> 75

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 75

Ala Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly Leu Gln Glu Gln Arg Asn His  
1 5 10 15

<210> 76

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 76

Ser Asp Leu Glu Thr Ser Gly Leu Gln Glu Gln Arg Asn His Leu  
1 5 10 15

<210> 77

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 77

Asp Leu Glu Thr Ser Gly Leu Gln Glu Gln Arg Asn His Leu Gln  
1 5 10 15

<210> 78

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 78

Leu Glu Thr Ser Gly Leu Gln Glu Gln Arg Asn His Leu Gln Gly  
1 5 10 15

<210> 79

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 79

Leu Gln Glu Gln Arg Asn His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu  
1 5 10 15

<210> 80

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 80

Gln Glu Gln Arg Asn His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln  
1 5 10 15

<210> 81

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 81

Gln Arg Asn His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln Val Glu  
1 5 10 15

<210> 82

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 82

Arg Asn His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln Val Glu Gln  
1 5 10 15

<210> 83

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 83

His Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln Val Glu Gln Thr Ser  
1 5 10 15

<210> 84

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 84

Leu Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln Val Glu Gln Thr Ser Leu  
1 5 10 15

<210> 85

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 85

Gln Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln Val Glu Gln Thr Ser Leu Glu  
1 5 10 15

<210> 86

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 86

Gly Lys Leu Ser Glu Leu Gln Val Glu Gln Thr Ser Leu Glu Pro  
1 5 10 15

<210> 87

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 87

Lys Leu Ser Glu Leu Gln Val Glu Gln Thr Ser Leu Glu Pro Leu  
1 5 10 15

<210> 88

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 88

Leu Glu Pro Leu Gln Glu Ser Pro Arg Pro Thr Gly Val Trp Lys  
1 5 10 15

<210> 89

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 89

Glu Pro Leu Gln Glu Ser Pro Arg Pro Thr Gly Val Trp Lys Ser  
1 5 10 15

<210> 90

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 90

Pro Leu Gln Glu Ser Pro Arg Pro Thr Gly Val Trp Lys Ser Arg  
1 5 10 15

<210> 91

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 91

Leu Gln Glu Ser Pro Arg Pro Thr Gly Val Trp Lys Ser Arg Glu  
1 5 10 15

<210> 92

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 92

Gln<sup>1</sup> Gln<sup>2</sup> Ser<sup>3</sup> Pro<sup>4</sup> Arg<sup>5</sup> Pro<sup>6</sup> Thr<sup>7</sup> Gly<sup>8</sup> Val<sup>9</sup> Trp<sup>10</sup> Lys<sup>11</sup> Ser<sup>12</sup> Arg<sup>13</sup> Glu<sup>14</sup> Val<sup>15</sup>

<210> 93

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 93

Glu<sup>1</sup> Ser<sup>2</sup> Pro<sup>3</sup> Arg<sup>4</sup> Pro<sup>5</sup> Thr<sup>6</sup> Gly<sup>7</sup> Val<sup>8</sup> Trp<sup>9</sup> Lys<sup>10</sup> Ser<sup>11</sup> Arg<sup>12</sup> Glu<sup>13</sup> Val<sup>14</sup> Ala<sup>15</sup>

<210> 94

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 94

Ser<sup>1</sup> Pro<sup>2</sup> Arg<sup>3</sup> Pro<sup>4</sup> Thr<sup>5</sup> Gly<sup>6</sup> Val<sup>7</sup> Trp<sup>8</sup> Lys<sup>9</sup> Ser<sup>10</sup> Arg<sup>11</sup> Glu<sup>12</sup> Val<sup>13</sup> Ala<sup>14</sup> Thr<sup>15</sup>

<210> 95

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 95

Pro<sup>1</sup> Arg<sup>2</sup> Pro<sup>3</sup> Thr<sup>4</sup> Gly<sup>5</sup> Val<sup>6</sup> Trp<sup>7</sup> Lys<sup>8</sup> Ser<sup>9</sup> Arg<sup>10</sup> Glu<sup>11</sup> Val<sup>12</sup> Ala<sup>13</sup> Thr<sup>14</sup> Glu<sup>15</sup>

<210> 96

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 96

Pro Thr Gly Val Trp Lys Ser Arg Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile  
1 5 10 15

<210> 97

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 97

Thr Gly Val Trp Lys Ser Arg Glu Val Ala Thr Glu Gly Ile Arg  
1 5 10 15

<210> 98

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 98

Ile Arg Gly His Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro  
1 5 10 15

<210> 99

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 99

Arg Gly His Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg  
1 5 10 15

<210> 100

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 100

Gly His Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser  
1. 5 10 15

<210> 101

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 101

Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys  
1. 5 10 15

<210> 102

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 102

Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met  
1. 5 10 15

<210> 103

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 103

Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln  
1. 5 10 15

<210> 104

<211> 35

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 104

Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys Phe Gly Arg Lys Met Asp  
1 5 10 15

Arg Ile Ser Ser Ser Gly Leu Gly Cys Lys Val Leu Arg Arg His  
20 25 30

Lys Lys Lys  
35

<210> 105

<211> 10

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 105

Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly Cys  
1 5 10

<210> 106

<211> 12

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 106

Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg  
1 5 10

<210> 107

<211> 13

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 107

His Arg Lys Met Val Leu Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg  
1 5 10

<210> 108

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 108

Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser  
1 5 10 15

<210> 109

<211> 16

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 109

Cys Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser  
1 5 10 15

<210> 110

<211> 11

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 110

Cys Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys  
1 5 10

<210> 111

<211> 13

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 111

Cys Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val  
1 5 10

<210> 112

<211> 14

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 112

Cys Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln  
1 5 10

<210> 113

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 113

Cys Tyr Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly  
1 5 10 15

<210> 114

<211> 13

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (1)..(1)

<223> ACETYLATION

<400> 114

Cys Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln  
1 5 10

<210> 115

<211> 14

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 115

Cys Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly  
1 5 10

<210> 116

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 116

Cys Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser  
1 5 10 15

<210> 117

<211> 16

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 117

Cys Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly  
1 5 10 15

<210> 118

<211> 11

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 118

Cys Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val  
1 5 10

<210> 119

<211> 12

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 119

Cys Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln  
1 5 10

<210> 120

<211> 12

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 120

Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Cys  
1 5 10

<210> 121

<211> 14

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 121

Cys Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser  
1 5 10

<210> 122

<211> 15

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 122

Cys Leu Arg Ala Pro Arg Ser Pro Lys Met Val Gln Gly Ser Gly  
1 5 10 15

<210> 123

<211> 11

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 123

Leu Gln Glu Gln Arg Asn His Leu Gln Gly Lys  
1 5 10

<210> 124

<211> 12

<212> PRT

<213> Séquence artificielle : peptide

<400> 124

Leu Glu Pro Leu Gln Glu Ser Pro Arg Pro Thr Gly  
1 5 10